



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados



GENERACIÓN DE UNA POBLACIÓN DE “PEPERINA”
***MINTHOSTACHYS VERTICILLATA* (GRISEB.) EPLING, MEJORADA**
POR SANIDAD, RENDIMIENTO Y CALIDAD DE ACEITES
ESENCIALES

Sonia Fabiana Ocaño

Tesis
Para optar al Grado Académico de
Doctora en Ciencias Agropecuarias

Córdoba, 2017

GENERACIÓN DE UNA POBLACIÓN DE “PEPERINA”
MINTHOSTACHYS VERTICILLATA (GRISEB.) EPLING, MEJORADA
POR SANIDAD, RENDIMIENTO Y CALIDAD DE ACEITES
ESENCIALES

Sonia Fabiana Ocaño

Comisión Asesora de Tesis

Directora de Tesis: Dra. Marta S. Ojeda

Asesora de Tesis: Dra. Gloria E. Barboza

Asesor de Tesis: Dr. Julio A. Zygodlo

Tribunal Examinador de Tesis

Dra. Julia Carreras

Dra. Eliana López Colomba

Dr. Julio A. Zygodlo

Presentación formal académica

22 de Noviembre de 2017

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

“Cuando yo tenía algún dolor, mi abuela me mandaba a las plantas”

Pabla Olsina
Campesina de Paravachasca

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis no hubiera sido posible sin la colaboración que prestaron de una u otra manera distintas instituciones y personas a quienes va todo mi agradecimiento:

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba, por darme el espacio y la posibilidad de desarrollar este proyecto de tesis.

A la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT - UNC), organismo que financió parcialmente la realización de este trabajo.

A la Dra. Marta Ojeda, quien aceptó ser la directora de este trabajo y resultó ser mi guía en “todos” los sentidos a lo largo de este camino.

A la Dra. Gloria Barboza por formar parte de la comisión asesora de tesis y por su generosidad a la hora de atender mis consultas.

Al Dr. Julio Zygodlo, por formar parte de la comisión asesora de tesis y por su disposición a atenderme siempre que lo necesite.

A todo el personal de la Escuela para Graduados de la Facultad de Ciencias Agropecuarias-UNC y en especial al Director Dr. Omar Bachmeier por su predisposición y atención.

A mis compañeras de equipo, Yamile, Lorena, Guadalupe, Paula, con quien compartimos ensayos, cursos, análisis y etc., etc., ¡¡¡muchas gracias!!!

A todos los alumnos y pasantes que durante todos estos años de proyecto participaron de alguna manera en esta tesis.

A María Elena y Daniel que con su familia y su emprendimiento “Marías del Cielo” me acompañan desde el principio y compartimos el amor por la peperina serrana.

Al Sr. Luis Lencina por permitirme ingresar a su campo a muestrear y recolectar parte del material inicial de este trabajo.

A la Flia. Andrada y toda la comunidad de San Jerónimo y Tala Cañada por la amabilidad, cariño y entusiasmo con el que siempre me recibieron en cada viaje realizado.

A los productores Benjamín Bernaldez, Patricia Vaca, David Rubin, Eduardo García, Julio Ganss, que gentilmente me permitieron interactuar con ellos e incluso llevar peperinas a sus campos.

A todo el personal del Campo Escuela de la Facultad de Ciencias Agropecuarias que ha estado presente en los distintos años de ensayos, acompañándome y facilitando siempre mi trabajo.

A Julia Tügel y toda la comunidad educativa del IPEMyT Lino E. Spilimbergo de la Localidad de Unquillo, Córdoba, por toda su colaboración en las evaluaciones sensoriales realizadas durante este trabajo.

Al grupo de familias de la localidad Mi Granja, y en memoria del Ing. Agr. Jorge Martínez fundador del grupo, que con entusiasmo me permitieron intervenir con mis propuestas y llevan adelante el cultivo de peperina y otras aromáticas en forma grupal.

A toda mi familia, por el acompañamiento de siempre, el apoyo e interés por mi trabajo.

A Marcelo, mi compañero en la vida, el mayor de los agradecimientos, por estar desde la primera muestra, la primera semilla, el primer plantín o la primera planta a campo, siempre, siempre ahí, acompañándome y ayudándome en todo y mucho más!

El esfuerzo, entusiasmo y goce en este camino recorrido como doctoranda, lo dedico en memoria de estas tres hermosas personas...

A Lucrecio R. Ocaño, mi padre, ejemplo en mi vida, a quien espero honrar con la mía.

A don Amador Inocencio Monje, a quien conocí gracias a este trabajo de tesis y admiré profundamente.

A Sara Rietti a quien tuve el honor y el placer de conocer y compartir con ella mis años de estudio en la maestría en Política y Gestión de la Ciencia y la Tecnología.

“Tenía una figura pequeña, menuda. Pero bastaba cruzar un par de palabras con ella para comprender rápidamente que esa aparente fragilidad iba acompañada de un espíritu irreductible. Sara Rietti fue la llama que alumbró momentos fundacionales y muchas veces difíciles del sistema científico nacional”.

RESUMEN

El proceso de mejoramiento de las plantas depende de la existencia de variabilidad genética a partir de la cual se pueda realizar selección. En este caso, poblaciones silvestres de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling “peperina” constituyeron la primera fuente de variabilidad genética junto a la selección de individuos derivados del cultivar Champaquí-FCA preexistente. Con el nuevo germoplasma obtenido se generó una población de base genética amplia que sirvió de población inicial para el proceso de selección propuesto en este trabajo. Esta nueva población generada mostró variabilidad para los caracteres evaluados y permitió definir los límites en cuanto a los caracteres criterio de selección como rendimiento vegetativo, tolerancia a virus *Cucumber mosaic virus* (CMV), rendimiento de aceites esenciales y respuesta al manejo cultural. A partir de allí se seleccionaron individuos, tomados como plantas madres (PM), que superaban la media poblacional del cultivar Champaquí-FCA en los distintos caracteres estudiados. En una segunda instancia de selección, se caracterizó fenotípicamente 19 familias derivadas de las PM selectas y se determinaron sus parámetros genéticos. Para algunos de los caracteres se estimaron valores de heredabilidad en sentido amplio entre un 25 y un 44%, encontrándose además en varios de los caracteres evaluados, valores superiores a la media de las plantas selectas de la población inicial. En una tercera instancia de selección, siguiendo descriptores morfológicos, de rendimiento, de tolerancia a CMV y de rendimiento en aceites esenciales, de las 19 Familias evaluadas, se descartaron siete familias por presentar síntomas de virosis y/o por bajo porcentaje de supervivencia a campo. El grupo de las 12 familias restante se utilizó para la extracción de aceites esenciales identificándose distintos perfiles químicos, los que se sometieron a pruebas sensoriales y se los clasificó de acuerdo a su aceptación o rechazo por parte del evaluador. Es así que el proceso final de selección se llevó a cabo sobre éstas familias selectas, tomando como criterio de selección el resultado de la evaluación organoléptica (aceptación o rechazo), seleccionando entre los individuos que se destacaron por presentar valores superiores en los caracteres morfológicos, resistencia al virus y rendimiento de aceites esenciales, formando a partir de ellos las poblaciones mejoradas.

Palabras clave: *Minthostachys verticillata*, peperina, poblaciones, cultivo, selección y mejoramiento genético vegetal.

ABSTRACT

The process of plant breeding depends on the existence of genetic variability from which selection can be made. In this case, wild populations of *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling “peperina” were the first source of genetic variability along with the selection of individuals derived from pre-existing Champaqui-FCA cultivar. With the new germplasm obtained, a population with a broad genetic base was generated that served as the initial population for the selection process proposed in this study. This new population generated showed variability for the traits evaluated and allowed to define the limits in terms of selection criteria such as biomass production, tolerance to *Cucumber mosaic virus* (CMV), yield of essential oils and response to cultural management. From there, individuals were selected as mother plants (PM), which surpassed the population mean of the cultivar Champaqui-FCA in the different characters studied. In a second selection instance, 19 families derived from the selected PM were phenotypically characterized and their genetic parameters were determined. For some of these traits, values of broad-sense heritability were ranged between 24 and 44%, and values higher than the average of selected plants of the initial population were found in several of the characters evaluated. In a third instance of selection, of the 19 families evaluated seven were discarded for showing symptoms of virus and/or low percentage of field survival. The remaining 12 families were subjected to sensory tests and classified according to their acceptance or rejection by the evaluator. Thus, the final selection process was carried out on these selected families, taking as a selection (acceptance or rejection), selecting among the individuals who stood out for having higher values in the morphological characters, Resistance to virus and yield of essential oils, forming from them the improved populations.

Key words: *Minthostachys verticillata*, peperina, populations, cultivation, selection and plant breeding.

TABLA DE CONTENIDOS	pág.
Capítulo 1.	17
- Introducción General	17
- Ubicación taxonómica de <i>M. verticillata</i>	18
- Descripción botánica de la especie	19
- Usos, aplicaciones y demanda de la especie	21
- Antecedentes de estudio de la “peperina” en Córdoba	23
- Hipótesis de Trabajo	25
- Objetivo General	26
- Objetivos Específicos	26
- Bibliografía	27
Capítulo 2. Caracterización y evaluación de poblaciones de peperina: Generación de una población base genéticamente variable	31
- Introducción	31
- Materiales y Métodos	35
- I- Obtención y caracterización del material de estudio	35
- II- Multiplicación y obtención de plantines	40
- III- Evaluación de las poblaciones a campo	42
- Resultados y Discusión	45
- I- Obtención y caracterización del material de estudio	45
- II- Multiplicación y obtención de plantines	54
- III- Evaluación de las poblaciones a campo	59
- Conclusiones	62
- Bibliografía	64
Capítulo 3. Variabilidad y parámetros genéticos en familias de peperina en proceso de selección	67
- Introducción	67
- Materiales y Métodos	72
- Evaluación de parámetros genéticos	74
- Obtención de plantines por propagación agámica	75
- Evaluación de plantines en invernadero	76
- Evaluación y caracterización de familias a campo	78

- Resultados y Discusión	78
- Obtención de plantines por propagación agámica	78
- Evaluación de plantines en invernadero	79
- Evaluación y caracterización de familias a campo	85
- Parámetros genéticos	89
- Conclusiones	90
- Bibliografía	94
Capítulo 4. Evaluación Sensorial	96
- Factores que influyen sobre los resultados	98
- Pruebas sensoriales	99
- Materiales y Métodos	100
- Selección del material a evaluar	100
- Pruebas sensoriales	102
- Análisis estadístico	102
- Resultados y Discusión	103
- Características de los evaluadores	106
- Propiedades organolépticas	107
- Integración de los atributos sensoriales de las muestras	112
- Perfil del AE de los materiales seleccionados	116
- Conclusiones	118
- Bibliografía	119
Capítulo 5. Conclusiones Generales	122
- Objetivos para futuras líneas de investigación	128
Anexos	130
- Anexo 1: Encuesta evaluación sensorial	131
- Anexo 2: Tabla Análisis de Varianza	132

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1	Ubicación geográfica, temperatura y precipitaciones de 9 sitios de recolección de poblaciones silvestres y en cultivo de peperina (<i>Minthostachys verticillata</i> (Griseb.) Epling), en la provincia de Córdoba, Argentina.	45
Tabla 2.2	Diferenciación de 9 poblaciones de peperina (<i>Minthostachys verticillata</i> (Griseb.) Epling), mediante los valores medios de los caracteres morfológicos y rendimiento de aceites esenciales evaluados.	48
Tabla 2.3	Porcentajes de Mentona y Pulegona en aceites esenciales extraídos de 9 poblaciones de peperina (<i>Minthostachys verticillata</i> (Griseb.) Epling).	51
Tabla 2.4	Valores medios de las variables medidas en los individuos evaluados, de acuerdo a su origen.	55
Tabla 2.5	Medidas de resumen para cada una de las variables evaluadas en la población base.	59
Tabla 2.6	Medidas de resumen para cada una de las variables evaluadas en tres poblaciones derivadas del cultivar de peperina, Champaquí-FCA.	62
Tabla 3.1	Valores medios para cada una de las variables medidas en plantines de la descendencia de plantas madres selectas.	83
Tabla 3.2	Valores medios de variables medidas en 19 familias provenientes de plantas madres obtenidas en la población base.	86
Tabla 3.3	Heredabilidad de caracteres productivos y varianzas que lo determinan: Varianzas genética, ambiental y Heredabilidad en sentido amplio.	90
Tabla 4.1	Porcentaje de respuesta para cada categoría en escala hedónica y medias generales del color de hojas, aroma de hojas y aroma de aceites esenciales, en las evaluaciones sensoriales realizadas en cuatro muestras de materiales selectos de peperina (<i>Minthostachys verticillata</i> (Griseb.) Epling)	114
Tabla 4.2	Porcentajes de Mentona y Pulegona en Aceites esenciales (AE) de cuatro muestras de familias selectas en <i>Minthostachys verticillata</i> (Griseb) Epling (peperina) y categorías de aceptación en evaluación sensorial	117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	<i>Minthostachys verticillata</i> (Griseb.) Epling. 1- Individuo silvestre; 2-Planta en cultivo; 3- Detalle de rama en flor.	20
Figura 1.2	Detalle de daño en hojas y crecimiento de la planta en un ejemplar de peperina con CMV	24
Figura 2.1	Ubicación geográfica de los sitios de muestreo de <i>Minthostachys verticillata</i> (Griseb.) Epling (peperina) en áreas de crecimiento espontáneo y en cultivo, dentro de la Provincia de Córdoba, Argentina.	37
Figura 2.2	Imagen ejemplo de hojas escaneadas para la determinación de los parámetros foliares.	38
Figura 2.3	Destiladores tipo Clevenger utilizados para la extracción del AE de <i>Minthostachys verticillata</i> (Griseb.) Epling (peperina).	39
Figura 2.4	Variabilidad de 9 poblaciones de <i>Minthostachys verticillata</i> (peperina) en estudio según los dos primeros ejes de un Análisis de Componentes Principales basados en caracteres geográficos y climáticos.	46
Figura 2.5	Comparación del rendimiento en ml. de aceites esenciales entre las poblaciones iniciales.	50
Figura 2.6	Variabilidad de 9 poblaciones de peperina (<i>Minthostachys verticillata</i> (Griseb.) Epling) en relación a caracteres morfológicos y bioquímicos de plantas según las 2 primeras componentes de un Análisis de Componentes Principales.	53
Figura 2.7	Dendrograma del agrupamiento de 9 poblaciones de peperina (<i>Minthostachys verticillata</i> (Griseb.) Epling), generado a partir de caracteres descriptores del ambiente y de las plantas.	54
Figura 2.8	Comparación de los valores medios de porcentajes de germinación entre Poblaciones: Población de Alta Gracia (A1), Población de Capilla de los Remedios (A2), Población de Ciudad de Córdoba (A2), Poblaciones de Salsipuedes (S1, S2 y S3), Poblaciones de San Jerónimo (L1 y L2) y Población de Tala Cañada (L3); a 7, 15 y 21 días desde la siembra.	56
Figura 2.9	Comparación de la altura media de plantín de 30 días entre poblaciones: Población Alta Gracia (A1), Población Capilla de los Remedios (A2), Población Capital (A3), Poblaciones de Salsipuedes (S1, S2 y S3), Poblaciones de San Jerónimo (L1 y L2) y Población de Tala Cañada (L3).	57
Figura 2.10	Comparación de parámetros foliares entre muestras de las distintas poblaciones	58

Figura 2.11	Ensayo a campo: 1) Trasplante de los plantines a campo. 2) Ensayo al segundo mes de implantado a campo y 3) Cultivo durante el inicio de la floración	59
Figura 2.12	Análisis de conglomerados con todos los caracteres evaluados entre los individuos de la población base.	60
Figura 2.13	Análisis de componentes principales de los caracteres evaluados en la población base.	61
Figura 3.1	Imágenes de los plantines clonales y de semillas, obtenidos de 19 individuos seleccionados en la población base.	76
Figura 3.2	Ensayo a campo: 1) Transplante de los plantines a campo; 2) Crecimiento de los plantines en los primeros días de cultivo; 3) Ensayo al primer mes de implantado a campo; 4) Ensayo al tercer mes de implantado a campo; 5) Cultivo al cuarto mes de implantado y 6) Cultivo durante el inicio de la floración..	77
Figura 3.3	Cultivo en los momentos: 1) Antes, 2) Durante y 3) Después de la cosecha.	78
Figura 3.4	Porcentaje de prendimiento de estacas clonales derivadas de 19 plantas madres (PM) selectas.	79
Figura 3.5	Comparación de porcentajes de germinación entre 19 familias estudiadas, a los 10, 15 y 21 días de sembradas.	80
Figura 3.6	Comparación de la altura media de plantín de 30 días entre los plantines de distintas familias.	81
Figura 3.7	Comparación del área foliar entre muestras de hojas de distintas familias.	82
Figura 3.8	Análisis de Componentes principales de caracteres cualitativos en plantines derivados de plantas madres (PM) selectas.	84
Figura 3.9	Análisis de conglomerados agrupando a Familias de plantines por caracteres evaluados.	85
Figura 3.10	Biplot según el plano conformado por las dos primeras componentes principales (CP1 y CP2), donde los puntos representan 19 Familias evaluados y los vectores representan las variables medidas.	88
Figura 3.11	Agrupamiento de Familias de peperina (<i>Minthostachys verticillata</i> (Griseb.) Epling) por conglomerado jerárquico dado por las variables evaluadas en plantas a campo.	89
Figura 4.1	Muestras de aceites esenciales y Material vegetal para la evaluación sensorial.	101
Figura 4.2	Porcentajes relativos de los compuestos mayoritarios en Aceites esenciales de cuatro muestras seleccionadas de peperina (<i>Minthostachys verticillata</i> (Griseb.) Epling).	104
Figura 4.3	Gráficas de distribución de edades y sexo de los encuestados.	107
Figura 4.4	Porcentajes de Ocupación entre los encuestados.	107

Figura 4.5	Frecuencias (%) para categorías de aceptación de Color de hojas secas en cuatro muestras de peperina.	109
Figura 4.6	Frecuencias (%) para categorías de aceptación de Aroma de las hojas en cuatro muestras de peperina.	111
Figura 4.7	Frecuencias (%) para categorías de aceptación de Aroma de Aceite Esencial (AE) en cuatro muestras de peperina.	112
Figura 4.8	Valores medios para la categoría de aceptación de todos los atributos sensoriales evaluados en cuatro muestras de hojas y aceite esencial de peperina.	113
Figura 4.9	Componentes principales de los atributos evaluados. Los puntos representan las cuatro muestras y los vectores representan las categorías de los atributos evaluados	115
Figura 4.10	Porcentaje relativo de los compuestos mayoritarios del AE en cuatro de las poblaciones mejoradas.	116

LISTA DE ABREVIATURAS

M.	<i>Minthostachys</i>
sp.	especie
Cba	Córdoba
FCA	Facultad de Ciencias Agropecuarias
UNC	Universidad Nacional de Córdoba
INASE	Instituto Nacional de Semillas
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
PM	Plantas madres
ANAVA	Análisis de la Varianza
ACP	Análisis de Componentes Principales
CP1	Componente Principal 1
CP2	Componente Principal 2
msnm	metros sobre el nivel del mar
TmE	temperatura media del mes enero
TmJ	temperatura media del mes de julio
ppma	precipitación media anual
Long.	longitud
Lat.	latitud
Alt.	longitud de la rama más larga
Alt cos	longitud de la rama más larga a cosecha
Alt plan	altura de plantín
AE	aceite esencial
Rto.AE	Rendimiento de aceite esencial
CG/EM	cromatografía gaseosa con espectrómetro de masas
Men	Mentona
Pul	Pulegona
M-P	Mentona mas pulegona
M+P%	Porcentaje de mentona mas pulegona
N° R	número de ramas por planta
PF	peso fresco

PS	peso seco
AF	área foliar
AH	ancho de hojas
LH	largo de hojas
A/L	relación ancho de hojas/largo de hojas
M	Malo
R	Regular
B	Bueno
MB	Muy bueno

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

Entre las especies vegetales que el hombre ha utilizado desde tiempos remotos con fines comerciales, se encuentran las plantas aromáticas y medicinales, muy codiciadas por ser utilizadas como medicina alternativa y por poseer un marcado interés económico. Los productos aromáticos tienen un mercado creciente, presentando demanda a nivel nacional e internacional, particularmente de los países más desarrollados, que requieren nuevos sabores y aromas. La respuesta a esta demanda necesita de una explotación racional de los recursos que se recolectan en los lugares donde crecen espontáneamente, ya que si no es así, se puede generar una pérdida de la diversidad genética de plantas medicinales y aromáticas, debido a la sobreexplotación de las especies en su hábitat natural (Roig, 2001).

En la provincia de Córdoba (Argentina), se encuentra muy difundida la comercialización de plantas aromáticas y medicinales silvestres, siendo las serranías del centro y noroeste, la zona en la que adquiere mayor relevancia la explotación de estas hierbas (Bocco *et al.*, 1997; Ojeda, 2008; Bustos, 2009). Esto implica un fuerte impacto sobre estos recursos vegetales naturales, tanto por su extracción, como por la posible pérdida irrecuperable de germoplasma como consecuencia de la erosión genética (Montenegro, 1987; Ojeda *et al.*, 2000).

De las especies espontáneas, la más buscada es la “peperina” *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling, siendo una de las plantas nativas que ha soportado mayor extracción (Montenegro, 1987; Bocco *et al.*, 1993; Martínez, 2004; Bustos, 2009). Es por ello que el cultivo de especies sobre-explotadas es una de las principales alternativas, pues contribuye a disminuir la presión sobre las plantas silvestres (Ojeda, 2004).

En este contexto es necesario lograr un equilibrio entre la conservación y el uso de los recursos naturales. Una estrategia válida para el uso de plantas aromáticas y medicinales silvestres es su cultivo, para poder proveer de suficiente materia prima que

cubra su demanda y aliviar la presión sobre las poblaciones silvestres, pudiendo ofrecer al medio un producto de calidad, homogéneo en sus caracteres organolépticos y con buenos rendimientos. La introducción al cultivo de especies silvestres se ha transformado en una necesidad, ya que es la forma de asegurar un abastecimiento continuo de plantas y material vegetal. Para lograr tal cultivo es necesario avanzar sobre la caracterización, manejo y mejoramiento de las especies nativas.

El cultivo de una especie silvestre, entendido en este sentido, implica un mejoramiento en la calidad de la materia prima, que permita una estandarización en el contenido de ingredientes activos y poblaciones homogéneas de plantas, características necesarias para su producción, procesamiento y utilización. Este es el motivo por el cual se iniciaron las investigaciones que se presentan en este trabajo, generando el mejoramiento de un determinado material vegetal de la especie *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling “peperina”, para poder ofrecer a la industria cantidad y calidad de material vegetal sin poner en riesgo las poblaciones naturales de la especie.

Ubicación taxonómica de *M. verticillata*

Esta especie pertenece a la familia Lamiaceae. Esta familia, también llamada Labiatae o Labiadas, comprende más de 170 géneros y 3000 especies de amplia distribución en regiones templadas y tropicales (Flórula digital, 2013; Farias, 2015). En la Argentina, está representada por 25 géneros y 87 especies (Farias, 2015).

La “peperina” pertenece al género *Minthostachys* que cuenta con 17 especies, todas originarias del sur de América tropical (Schmidt-Lebuhn, 2008 a).

En Argentina, se utiliza el nombre “peperina” para designar a distintas especies: *Hedeoma multiflorum*, *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling, *Clinopodium boliviana* (Benth) Briq. y *Clinopodium odorum* (Griseb.) Harley; todas pertenecientes a la familia Lamiaceae (de la Peña y Pensiero, 2004).

La “peperina” bajo estudio corresponde a *M. verticillata* (Griseb.) Epling. y se ubica en la Subfam. Nepetoideae, Tribu Mentheae. Existe una gran confusión en la literatura sobre el nombre correcto que debe aplicarse a las poblaciones de “peperina” que habitan en la Argentina. Esta confusión se genera por el criterio a seguir en cuanto

al número de especies que se acepte para *Minthostachys*, lo que depende de la circunscripción que los distintos autores aplican a las especies (Epling, 1936; Schmidt-Lebuhn, 2008b). Así, el número de especies varía de 12 a 17, con algunas entidades aún indescritas (Schmidt-Lebuhn, 2008a). En 2008, Schmidt-Lebuhn publicó dos trabajos que dieron luz sobre la taxonomía de este género. El primero (Schmidt-Lebuhn, 2008a) se refiere a un estudio morfológico-molecular que puso de manifiesto la monofilia de *Minthostachys* y sus relaciones intergéricas; en este trabajo *M. mollis* y *M. verticillata* aparecen en subclados distintos. En el segundo (Schmidt-Lebuhn, 2008b), este autor presenta la revisión taxonómica del género donde acepta 17 especies y allí, diferencia a *M. verticillata* de *M. mollis*.

Siguiendo el criterio de Schmidt-Lebuhn, *M. verticillata* es endémica en Argentina, nombre que actualmente se sigue en los tratamientos florísticos del Cono Sur y Argentina, quedando restringida para el centro-oeste de nuestro país (Tucumán, Catamarca, La Rioja, Córdoba y San Luis).

Descripción botánica de la especie

La “peperina” (Fig. 1.1) es un semiarbusto aromático de 0,30 a 2 m de altura, perenne, con tallos cuadrangulares y ramas ceniciento-pubescentes con pelos simples y glandulares (Bonzani y Ariza Espinar, 1993), hojas de 1 a 5 cm de largo, ovadas, generalmente agudas, redondeadas en la base, ambas caras pubescentes, sostenidas por pecíolos de 5 a 10 mm de largo, de margen entero o irregularmente aserrado, envés más claro y con pubescencia acentuada.

Las flores son pediceladas dispuestas en cimas axilares. Cáliz de 2-3 mm long., poco acrescente en el fruto, hirsuto en la cara externa, cara interna con carpostegio; dientes deltoides, agudos, de 1-1,5 mm long. Corola blanca, zigomorfa, tubulosa-bilabiada, pubescente en la cara interior y en el dorso de los labios; labio superior 2-lobado, inferior 3-lobado, lóbulos crenulados. Estambres didínamos, los anteriores más largos que los posteriores, filamentos de 1-2 mm de long., pubescentes en el tercio inferior. Gineceo con ovario súpero, 4-lobado, estilo de 3 mm de long., glabro, bífido, ramas estigmática inferior poco mayor que la superior. Fruto seco y compuesto por 4

núculas elipsoides, pardas, lisas o finamente reticuladas, de 1 mm de long., que al madurar dan entre 1 a 4 semillas.



Figura 1.1. *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling: 1-Individuo silvestre; 2- Planta en cultivo; 3- Detalle de rama en flor.

Fenología: Florece en verano y fructifica en verano hasta el otoño. Se multiplica por gajos y semillas (Epling, 1939; Dimitri, 1972; Soraru y Bandoni, 1978; Bonzani y Ariza Espinar, 1993; Gupta, 1995; Barboza *et al.*, 2001; Barboza *et al.*, 2006; Barboza *et al.*, 2008). Posee un olor característico, muy semejante a la menta, determinado por la presencia de aceites esenciales. Para un mejor aprovechamiento de estos compuestos, las plantas se cosechan durante la floración, ya que se considera que en ese momento contienen la mayor cantidad de aceites (Muñoz, 2000). Presenta un buen rebrote.

Distribución y hábitat

En Argentina, “peperina” es sinónimo de Córdoba, provincia serrana de la región central, donde la especie crece en forma espontánea y tiene un importante valor cultural dado por el uso tradicional que se hace de ella.

La especie también crece en otras provincias del noroeste del país, como San Luis, Catamarca, La Rioja y Tucumán. Dentro de su distribución se la encuentra entre los 700 y los 2300 msnm, en regiones con promedios de precipitación anual superiores a

800 mm y sobre suelo fértil y suelto. En la provincia de Córdoba, habita en las zonas serranas, entre 700 y 1200 m de altura (Epling, 1939; Fester *et al.*, 1956; Parodi, 1959; Soraru y Bandoni, 1978; Ratera y Ratera, 1980; Boelcke, 1989; Alkire *et al.*, 1994; Gupta, 1995; Carvajal y Thilly, 1998). Crece en suelos someros, pedregosos, en laderas generalmente protegidas por especies arbóreas, en mollaras de *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl., en espinillares de *Acacia caven* (Molina) Molina y *Acacia furcatispina* Burkart, o bosques abiertos de laurel, *Cinnamomum porphyrium* (Griseb.) Kosterm. y coco o cochucho, *Zanthoxylum coco* (Gillies ex Hook. f. & Arn.).

Usos, aplicaciones y demanda de la especie

Desde siempre esta especie fue muy empleada por las comunidades nativas y campesinados de Argentina. Ya Hieronymus en 1882 mencionaba su empleo con éxito contra el cólera por parte de los serranos de Córdoba. La infusión con sus hojas y flores fueron y son usadas como estomacal, antiespasmódica, antidiarreica, antiemética, antirreumática, carminativa, sedante, y sólo sus hojas como hemostático sobre heridas (Ojeda y Karlin, 2015). También se emplea como saborizante y aromatizante en la elaboración de licores y bebidas amargas. Su principal uso actual es en la yerba mate, para la elaboración de yerbas compuestas para lo cual es altamente demandada.

La recolección desmedida e irracional de la “peperina” en las zonas serranas de Argentina ha puesto a este arbusto en peligro de extinción. Ello obedece a una demanda creciente lo que ha ocasionado que poblaciones silvestres estén sobre-presionadas por la recolección. Como consecuencia de esta sobre-explotación, surge la necesidad de la puesta en cultivo de la peperina, con el objetivo de proponer un sistema de producción sustentable, como alternativa a la extracción directa de su ambiente natural. Además, el conocimiento de los requerimientos de la especie posibilita el diseño de estrategias para el aprovechamiento sustentable del recurso en aquellas localidades donde crece en forma espontánea, constituyéndose de ese modo en un ingreso económico más estable para los lugareños.

Confirmando estas características que se dan en el uso de esta especie, Martínez *et al.* (2003) sugieren a la peperina (sub nom. *M. mollis*) como una de las ocho especies locales que deben recibir medidas de conservación prioritarias para el Valle de

Paravachasca (provincia de Córdoba). Este estudio considera la sensibilidad ecológica, la demanda comercial y el estatus de la especie en el área, por lo que refleja integralmente su estado e importancia respecto a la utilización. Es así que el cálculo del índice de prioridad de conservación (ICP) para la peperina recibió el valor más alto de un total de 84 especies examinadas.

Martínez (2005) estudió la recolección y venta de plantas medicinales en el departamento de Santa María, provincia de Córdoba, Argentina. Como era de esperarse también para esta área, *M. verticillata* (sub nom. *M. mollis*) resultó ser la especie que se consume en mayor cantidad. Las plantas son recolectadas generalmente por lugareños y se comercializan secas o semi-procesadas en comercios locales o a turistas en puestos callejeros.

Aceite esencial de “peperina”

Las esencias son mezclas de compuestos que proveen a las plantas aromáticas su aroma característico, llamados comúnmente aceites esenciales (AE). Estos aceites esenciales están constituidos principalmente por terpenos y sesquiterpenos que se originan en el metabolismo secundario de la planta, presentando la particularidad de ser volátiles a temperatura ambiente y presión atmosférica normal (Zygodlo, 2011) y son además los responsables del aroma de cada planta en particular (Chamorro *et al.*, 2012).

Los componentes característicos del aceite esencial de la peperina son principalmente mentona y pulegona, y posee además pequeñas cantidades de otros compuestos como ser isomentona y limoneno (Retamar y Mazzola, 1963; Pomar, 1993; Retamar, 1988; Zygodlo *et al.*, 1996).

En estudios donde se analizaron muestras recolectadas *in situ* de distintas poblaciones de peperina, se encontraron grandes variaciones en cuanto a la composición de aceites esenciales, principalmente en la relación mentona – pulegona; posteriormente se observó que esa misma variabilidad se mantiene cuando esas muestras fueron cultivadas en un mismo ambiente *ex situ* (Ojeda, 2004; Ocaño, 2015).

En cuanto a los efectos de aceites esenciales y/o extractos de esta especie, se han realizado numerosos estudios y evaluaciones que muestran la importancia de la misma como recurso interesante por sus propiedades biocidas e inmunológicas (Ocaño, 2015).

Antecedentes de estudio de la “peperina” en Córdoba

Desde el año 1996 se desarrolla en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba, un proyecto sobre la conservación, domesticación y mejoramiento de la peperina y otras especies aromáticas. Para ello se realizaron estudios que permitieron avanzar en el conocimiento de la especie a nivel morfológico, bioquímico y de manejo cultural (Ojeda *et al.*, 2004).

Bajo la hipótesis de que la variabilidad existente en poblaciones silvestres y el ajuste de técnicas de manejo cultural, facilitarían el cultivo de la especie y la selección de genotipos superiores, se planteó como objetivo caracterizar las poblaciones silvestres, tanto en su hábitat natural como bajo condiciones de cultivo, y establecer criterios para su manejo y mejoramiento genético. Los resultados obtenidos permitieron la caracterización de poblaciones nativas en áreas de crecimiento espontáneo del Noroeste Argentino (Tucumán, Catamarca, Córdoba y San Luis). Además, se determinó la variabilidad intra- e interpoblacional iniciando la selección de los individuos con mejores características (Ojeda *et al.*, 1998; Ojeda, 2004).

De cada población que se localizó y caracterizó dentro de la zona de distribución de la especie en la Argentina, se recolectó y conservó germoplasma y, se identificaron muestras para su documentación en herbarios. Posteriormente, se establecieron las condiciones básicas para el manejo cultural de la especie, encontrándose interacción significativa entre las poblaciones y los tratamientos de manejo ensayados (Ojeda, 2004).

El análisis *ex situ* de la variabilidad entre clones obtenido de las poblaciones muestreadas, mostró variación remanente para una adecuada respuesta a la selección en aspectos tales como, producción de biomasa y contenido de aceites. Los caracteres propuestos como descriptores, fueron los siguientes: longitud de rama, peso fresco (PF) y peso seco (PS) de planta y rendimiento de aceite por planta. Finalmente, se

identificaron y describieron cinco clones de peperina en selección avanzada; tres de ellos con mejor adaptación para su cultivo bajo media sombra y dos para cultivo sin cubierta (Ojeda, 2004). De éstos últimos, se destaca la inscripción de un cultivar de peperina, llamado cultivar Champaquí-FCA, el cual presenta características productivas destacadas en cuanto a producción de materia seca y adaptación a condiciones de cultivo. Además, este es el primer cultivar de una especie aromática y medicinal nativa de Argentina (Ojeda, 2011).

Durante los ciclos de cultivo de domesticación, se determinó por primera vez en la especie la presencia del *Cucumber mosaic virus* (CMV) ocasionando serios daños en hoja y sobre el crecimiento de las plantas (Fig. 1.2). Al respecto, la sintomatología que se observó, pudo asociarse con la presencia de los serogrupos I y II de dicho patógeno viral, produciendo síntomas que afectan las hojas en su tamaño, forma y color, lo cual evidencia una amenaza potencial para el cultivo de la peperina.



Figura 1.2. Detalle de daño en hojas y crecimiento de la planta en un ejemplar de peperina con *Cucumber mosaic virus* (CMV)

También se observó, que entre las plantas que componen las poblaciones seleccionadas, existían individuos que no presentaban síntomas de virus, aún estando en presencia del agente transmisor. Esto estaba indicando individuos con mayor tolerancia

al ataque del virus, por lo que es de esperar que esa tolerancia esté relacionada a caracteres heredables.

Por otra parte, en el proceso de selección se modificaron las proporciones de los distintos componentes de los aceites esenciales de la peperina en comparación con las poblaciones de inicio, no siendo este aspecto contemplado, ya que los objetivos de la selección realizada estaban orientados solamente hacia la producción de materia seca y la adaptación a condiciones de cultivo.

A partir de ensayos con materiales derivados de poblaciones nativas se puede acceder a caracteres de interés agronómico con amplia variabilidad (Wright, 1976; Zobel y Talbert, 1988). Estos ensayos sirven como población base de los posteriores programas de mejoramiento, ya que constituyen la fuente de variación genética de fácil acceso, a donde es posible recurrir para ampliar los rangos de selección o incorporar nuevas características de interés. Los métodos de mejora en plantas alógamas, permiten la obtención de poblaciones mejoradas. Es por ello que para mejorar la composición de los aceites se puede recurrir a poblaciones naturales que se constituyen en fuentes de estos caracteres para ser incorporados a las poblaciones selectas (Di Feo *et al.*, 2004; Ramírez, 2006).

Dadas estas características en el material obtenido, es que se decide iniciar una nueva etapa de investigación para avanzar en el mejoramiento de la especie, sin perder los caracteres de interés agronómicos obtenidos en los trabajos precedentes. Continuar el mejoramiento de la especie a partir del cultivar ya inscripto mediante la reintroducción de germoplasma silvestre en un plan de mejoramiento, buscando obtener poblaciones mejoradas en los caracteres componentes del rendimiento, tolerancia al virus (CMV) y mayor calidad organoléptica.

Hipótesis de trabajo

Dentro de la variación fenotípica que poseen las distintas poblaciones de peperina, puede encontrarse una fracción de variación, debida al genotipo, en caracteres de interés agronómico, como lo son la producción vegetativa y la cantidad y calidad de

aceite esencial, los cuales pueden ser seleccionados para obtener poblaciones con características superiores a las originales.

Objetivo general

Obtener, por selección, poblaciones mejoradas de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling “peperina” en los caracteres componente del rendimiento, tolerancia al virus (CMV) y rendimiento y calidad de aceite esencial.

Objetivos específicos

1. Generar una población de base genética amplia de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling mediante la recombinación entre plantas provenientes de poblaciones de distinto origen.
2. Evaluar en un ciclo de cultivo de la población base la variabilidad en rendimiento vegetativo, tolerancia a virus *Cucumber mosaic virus* (CMV), rendimiento de aceites esenciales y respuesta al manejo cultural.
3. Evaluar las modificaciones en caracteres de rendimiento en materia vegetal y aceites esenciales, producidas por la recombinación entre el germoplasma de las poblaciones silvestres y el cultivar Champaquí-FCA.
4. Determinar a nivel fenotípico, genotípico y ambiental, los componentes de la varianza y la heredabilidad en sentido amplio, en familias de peperina en proceso de selección.
5. Evaluar las propiedades organolépticas del material obtenido a través de análisis sensoriales en las comunidades de interés (recolectores, pequeños productores, consumidores).
6. Seleccionar individuos, siguiendo descriptores morfológicos, de rendimiento, de tolerancia a virus (CMV), de rendimiento en aceites esenciales y características organolépticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alkire, B. H.; Tucker, A.O. and Maciarelo, M. J. 1994. Tipo, *Minthostachys mollis* (Lamiaceae): an ecuadorian mint. Economic Botany 48 (1): 60-64.
- Barboza, G. E.; Cantero, J. J.; Núñez, C.; Pacciaroni, A. y Ariza Espinar, L. 2008. Native Medicinal Flora of Argentina: a checklist, chemical composition, biological activity and analysis of its diversity XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil & X International Congress of Ethnopharmacology, São Paulo, Brazil. 16-19 de septiembre de 2008.
- Barboza, G. E.; Cantero, J.; Nuñez, C. O. y Ariza Espinar, L. 2006. Flora Medicinal de la Provincia de Córdoba (Argentina). Pteridófitas y Antófitas Silvestres o Naturalizadas. Editores: Ariza Espinar, Luis; Barboza, Gloria E.; Cantero, Juan José y Nuñez, César O. Museo Botánico Córdoba, 1ª Ed.; Córdoba, Argentina. 1264 pp.
- Barboza, G.; Bonzani, N.; Filippa, E.; Luján, C.; Morero, R.; Bugatti, M.; Decolatti, N. y Ariza Espinar, L. 2001. Atlas histo-morfológico de plantas de interés medicinal de uso corriente en Argentina. Editorial Museo Botánico Córdoba. Serie Especial I. Córdoba, Argentina. 212pp.
- Bocco, M.E.; Montani, N.; y Vischi, I. 1993. Relevamiento de las plantas medicinales y/o aromáticas del Departamento de Río Cuarto (Córdoba) en relación a su explotación. Anales del SAIPA 11: 217-225.
- Boelcke, O. 1989. Plantas vasculares de la Argentina, nativas y exóticas. 2º edición. Hemisferio Sur S. A. Bs. As. Argentina, 241 pp.
- Bonzani, N. y L. Ariza Espinar. 1993. Estudios anatómicos de tres especies de lamiaceae usadas en medicina popular. Acta Farm. Bonaerense 12(3): 113-123.
- Bustos, J. A. 2009. Caracterización poblacional y de hábitat de la peperina (*Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb.) en el noroeste de Córdoba. Tesis de Magister. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, 82 pp.
- Carvajal, G. y Thilly, W. 1998. Mutagenic activity of *Minthostachys mollis* in AHH1 lymphoblast cells. Plant Foods for Human Nutrition 38:105-114.
- Chamorro, E. R.; Ballerini, G.; Sequeira, A. F.; Velasco, G. A. and Zalazar, M. F. 2012. Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. leaves and flowers. Journal of the Argentine Chemical Society 96 (1-2): 80-86.

- De la Peña, M. R. y Pensiero, J. F. 2004. Plantas Argentinas. Catálogo de nombres comunes. Editorial LOLA. Buenos Aires, 373 pp.
- Di Feo, L.; Ojeda, M. y Biderbost, E. 2004. *Cucumber mosaic virus* en cultivo de peperina [*Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb.]. Argentina. XXVI Congreso Argentino de Horticultura.
- Dimitri, M. J. 1972. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Vol.: 1. Ed. Acme SACI. Bs. As, 1161 pp.
- Epling, C. 1939. Las Labiadas en el Noroeste de la Argentina. Lilloa 4: 434-435.
- Fariás, G. 2015. Guía de Consultas Botánica II. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE).
- Fester, G. A., Martinuzzi, E.A., Retamar, J. A. y Ricciardi, A. I. A. 1956. Estudios de esencias volátiles de Córdoba y San Luis. Bol. Acad. Nac. de Cs., Córdoba, Arg. XXXIX: 375-416.
- Florula Digital. 2013. Florula digital de la Estación Biológica La Sela. Departamento científico. Publicado en Internet, disponible en <http://sura.ots.ac.cr/local/florula4> Activo Julio 2017.
- Gupta, M. P. 1995. 270 plantas medicinales Iberoamericanas. Convenio Andrés Bello. CYTED. Bogotá, Colombia. pp.318-319.
- Martínez, G. 2004. Estudio etnobotánico de las plantas vinculadas con la medicina tradicional de los campesinos de Paravachasca y Calamuchita, Provincia de Córdoba. Aportes para su conservación. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, 156 pp.
- Martínez, G. 2005. Recolección y comercialización de plantas medicinales en el departamento Santa María, Provincia de Córdoba, Argentina. Acta Farmacológicas Bonaerense 24: 575-584.
- Martínez, G.J.; Planchuelo, A. M.; Fuentes, E. y Ojeda, M. S. 2003. A numeric index to establish conservation priorities for medicinal plants in the Paravachasca Valley, Córdoba, Argentina. Biodiversity and Conservation 15: 2457-2475.
- Montenegro, R. 1987. Análisis del manejo y comercialización de plantas medicinales y aromáticas en la provincia de Córdoba. Informe de la Dirección de Gestión Ambiental, Ministerio de Planeamiento y Coordinación, Gobierno de Córdoba.

- Muñoz, F. 2000. Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado. Ed. Mundi-Prensa. España, 336 pp.
- Ocaño, S. 2015. Generación de poblaciones de peperina (*Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling) mejoradas por rendimiento, sanidad y calidad de aceites esenciales. En: Plantas Aromáticas y Medicinales: Modelos para su Domesticación, Producción y Usos Sustentables. Ojeda, M.S. y Karlin, U. O. (Eds). Editorial Universidad Nacional de Córdoba. pp. 83-100.
- Ojeda, M. 2004. Caracterización de poblaciones y avances en la domesticación de peperina *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. pp.134.
- Ojeda, M. 2008. Alertan sobre la escasez de peperina “el yuyo cordobés”. En: La Voz del Interior, Córdoba, Argentina, Marzo, 23. p. A 14.
- Ojeda, M. 2011 La Peperina: Caracterización de poblaciones y avances en la domesticación. Ed. Académica Española (EAE). 152 pp.
- Ojeda, M.; Sanchez, M.; Bielkiewicz, E. y Capelletti, L. 1998. Determinación del porcentaje de germinación de distintas poblaciones de peperina, *Minthostachys mollis*. En: XII Congreso Nacional de Recursos Naturales, Aromáticos y Medicinales (SAIPA). 18 al 20 de noviembre de 1998. Córdoba.
- Ojeda, M., Coirini, R., Carrera, J., Carrizo, M. y Palacio, L. 2000. Aprovechamiento sustentable de la peperina. Editorial Triunfar S. A. Córdoba, Argentina, 38 pp.
- Ojeda, M. S. y Karlin, U. O. 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. (Eds). Editorial Universidad Nacional de Córdoba. 183 pp.
- Parodi, L. 1959. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. ACME. Bs. As. Tomo I: 819 pp.
- Pomar S. 1993 Contenido y variación del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling en distintos órganos y épocas del año. En: Seminario Ciencias Biológicas FCFN, UNC. Córdoba.
- Ramírez, L. 2006. Mejora de plantas alógamas. Editorial Universidad de Navarra. Navarra, España, 231 pp.

- Ratera, E. L. y Ratera, M. O. 1980. Plantas de la flora Argentina empleadas en medicina popular. Edit. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. 186 pp.
- Retamar, J. 1988. Phytochemical modifications in aromatic species. Essential oils, flavours, fragrances and cosmetics. 92: 202 – 216.
- Retamar, J. A. y Mazzola, E. B. 1963. Estudios sobre hidrogenación de la esencia de peperina. Revista de la Facultad de Ingeniería Química Universidad Nacional de Litoral, 33 49-55.
- Retamar, J.A.; Malizia, R.A.; Molli, J. S. y Cardell, D. A. 1996. Química fina aplicada al aceite esencial de peperina. *Essenze-Derivati Agrumari*, 66: 279-287.
- Roig, F. A. 2001. Flora medicinal mendocina. Las plantas medicinales y aromáticas de la provincia de Mendoza (Argentina). EDIUNC. Argentina. Serie Manuales. 33: 390.
- Schmidt-Lebuhn, A. 2008 a. Monophyly and phylogenetic relationships of *Minthostachys* (Labiatae, Nepetoideae) examined using morphological and nrITS data. *Plant Systematics and Evolution*. 270:25-38.
- Schmidt-Lebuhn, A. 2008 b. Ethnobotany, biochemistry and pharmacology of *Minthostachys* (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 118: 343-353.
- Soraru S. y A. Bandoni. 1978. Plantas de la medicina popular argentina. Editorial Albatros. Buenos Aires, Argentina, 164 pp.
- Wright, J. W. 1976: Introduction to forest genetics, Academic Press, New York, 463 pp.
- Zygodlo, J. A. 2011. Los aceites esenciales. Aspectos básicos de su química y biosíntesis. Composición de los aceites esenciales de plantas aromáticas Argentinas. En: Aceites esenciales. Química, ecología, comercio, producción y salud. Editorial Universitas. Córdoba, Argentina, 192 pp.
- Zygodlo, J.; Maestri; D.; Lamarque, A.; Guzmán, C.; Velasco-Negueruela, A.; Pérez-Alonso, M.; García-Vallejos, M. y. Grosso, N. 1996. Essential oil variability of *Minthostachys verticillata*. *Biochemistry Systematic Ecology*; 24 (4): 319-323.
- Zobel, B. y Talbert, J. 1988. Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales, Editorial Limusa, 545 pp.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE POBLACIONES DE PEPERINA: GENERACIÓN DE UNA POBLACIÓN BASE GENETICAMENTE VARIABLE

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se ven amenazados muchos recursos fitogenéticos que pueden ser vitales para el desarrollo agrícola y la seguridad alimentaria en el futuro. En este sentido, es preocupante la ocurrencia de una pérdida irreversible de genes, siendo éstos, la unidad fundamental básica de la herencia y fuente primordial de la variación del aspecto, la caracterización y el comportamiento de las plantas. La conservación racional (tanto *in situ* como *ex situ*) de los mismos, empieza por el estudio y caracterización de los recursos que existen en cada lugar (FAO, 1996). Al respecto, cuando en una determinada área hay especies de interés muy presionadas por su uso, es necesario que se realice una recolección de germoplasma conjunta con la caracterización y evaluación de dicho material, procurando asegurar una alta variabilidad genética.

El material recolectado para caracterizar poblaciones locales debe ser representativo de la variabilidad genética que la especie presenta en su hábitat, ya que las poblaciones de una especie, dentro de una región, pueden diferir genéticamente en distinta medida dando origen a ecotipos y/o clinas (Ojeda, 2004).

El estudio de la variabilidad existente dentro de las especies permite determinar las estrategias para la conservación *in situ* y *ex situ*. Por “conservación *in situ*” se entiende la conservación de los ecosistemas y los hábitats naturales donde se desarrollan estas especies, el mantenimiento y recuperación de poblaciones en sus entornos naturales y, en el caso de las especies domesticadas y cultivadas, los entornos en que hayan desarrollado adaptaciones específicas. Por “conservación *ex situ*” se entiende la conservación de componentes de la diversidad biológica fuera de sus hábitats naturales (Ojeda *et al.*, 2015).

En los últimos años el conocimiento empírico del uso de las plantas medicinales y aromáticas comenzó a encontrar un sustento científico, dando valor incluso a la riqueza tanto en diversidad como en variabilidad de estas especies. De los avances en los conocimientos de estas plantas se ha llegado a que alrededor de un 35 % del total de los medicamentos que se aprueban año a año, son derivados de especies vegetales (Kursar *et al.*, 2007).

La Argentina posee condiciones muy favorables e importantes para desarrollar nuevos productos basados en sus especies nativas ya que cuenta con una gran diversidad de ambientes que favorecen la biodiversidad, además de poseer conocimientos de los pueblos originarios que usan numerosas plantas en su vida cotidiana. Por otra parte, el país cuenta con tecnología y posibilidades de desarrollar un manejo en cultivo de las especies que tengan importancia o gran demanda de la industria. Si a estas condiciones mencionadas le sumamos el asesoramiento e interacción con grupos de investigación de Universidades y otros, las oportunidades que se pueden generar se multiplican (Ojeda *et al.*, 2015).

A distintos niveles de gobierno: nacional, provinciales o municipales, se han llevado adelante acciones tendientes a preservar y manejar especies aromáticas nativas. En este sentido, desde el ámbito técnico y académico se está procurando la puesta en cultivo de plantas medicinales y aromáticas con un doble objetivo: preservar el recurso silvestre y promover su introducción a cultivo para responder a demandas industriales. Para ello, se plantea lograr calidad, cantidad y continuidad en la producción, siendo entonces muy importante caracterizar, manejar y mejorar las especies nativas. Los resultados obtenidos de este proceso contribuirán a la valorización y aprovechamiento adecuado de los recursos naturales en sus ambientes, a la vez que posibilitarán brindar alternativas laborales y un ingreso económico en zonas donde la agricultura tradicional no es practicable, ayudando a evitar la emigración rural y generar diversificación en las producciones (Ocaño, 2015).

La posibilidad de introducir a cultivo una especie silvestre, permite lograr una producción constante y más homogénea en cuanto a calidad. Particularmente para el caso de las plantas aromáticas y medicinales, la amplia variabilidad morfológica y química es consecuencia de la genética de las plantas y sus respuestas adaptativas a los

ambientes donde se desarrollan (Amujoyegbe *et al.*, 2012). Si bien desde el punto de vista ecológico y ambiental esta característica es positiva y muy necesaria no favorece al mercado ya que éste demanda estabilidad y homogeneidad en la calidad del material.

Para conocer, conservar y usar sustentablemente un recurso natural, es necesaria su caracterización y evaluación. De este modo se describen los atributos que permiten diferenciar poblaciones de una misma especie y determinar su estructura, variabilidad y utilidad (Jaramillo y Baena, 2000). Es importante definir con claridad el concepto “población” ya que permanentemente se estará refiriendo a poblaciones de la especie en estudio durante todo el proceso de un plan de domesticación y /o mejoramiento. Así, en el campo de la biología, Población Biológica, es un conjunto de organismos o individuos de la misma especie que coexisten en un mismo espacio y tiempo, y que comparten ciertas propiedades biológicas, las cuales producen una alta cohesión reproductiva y ecológica del grupo. La cohesión reproductiva implica el intercambio de material genético entre los individuos. La cohesión ecológica se refiere a la presencia de interacciones entre ellos, resultantes de poseer requerimientos similares para la supervivencia y la reproducción, al ocupar un espacio generalmente heterogéneo en cuanto a la disponibilidad de recursos.

En biología, un sentido especial de la población, empleado en genética y evolución, es para llamar a un grupo reproductivo cuyos individuos se cruzan únicamente entre sí, aunque biológicamente les fuera posible reproducirse también con todos los demás miembros de la especie o subespecie. Las principales causas por las que resultan delimitadas las poblaciones son el aislamiento físico y las diferencias del comportamiento.

A través de los caracteres morfológicos cualitativos y cuantitativos, es como se pueden describir las poblaciones a los fines de establecer criterios para su manejo y aprovechamiento, tanto de poblaciones silvestres como de cultivos. Complementariamente, la evaluación consiste en describir el rendimiento de material vegetal y en el caso de las plantas aromáticas también su producción de aceites esenciales. Estos indicadores están asociados a caracteres cuantitativos que son más variables con el ambiente y por lo general de baja heredabilidad.

La caracterización y evaluación de una especie, como comienzo de un proceso de selección y cultivo, requiere de una población inicial que represente su variabilidad natural, la cual se denomina: población de base genética amplia. Dicha población está formada por individuos obtenidos de semillas o estacas recolectados de todos los lugares muestreados. En especies alógamas esa variabilidad es mayor por lo que es necesario que esa población con la que se inicia el cultivo sea grande.

Para realizar la recolección de germoplasma es necesario ubicar debidamente los lugares donde potencialmente habiten poblaciones. Para ello, es posible recurrir a la información que lugareños pueden ofrecer sobre ubicación, usos y otros acontecimientos relacionados con el recurso genético en estudio. En primer lugar es necesario diferenciar poblaciones que habiten un área restringida con condiciones ecológicas relativamente homogéneas. Por ello resulta necesario documentar las condiciones que caracterizan y distinguen a los distintos sitios de recolección.

A partir del cultivo de una población manejada uniformemente, el proceso continúa con la selección de individuos que se destaquen por caracteres de interés con el fin de obtener los mejores genotipos posibles (Cubero, 2003). De esta manera se realizan selecciones sucesivas de genotipos en base a características deseadas. La expresión de dichas características se observa en el fenotipo de la planta, pero debe ser una manifestación del genotipo y no un efecto del ambiente (Jaramillo y Baena, 2000).

Los caracteres morfológicos que se seleccionen para su medición dependen de la especie en estudio, por lo tanto es importante elegir caracteres que permitan identificar la especie y sobre todo los que permitan mostrar las variaciones existentes, es decir que sean válidos como descriptores. Hay caracteres marcadores morfológicos que permiten encontrar asociaciones significativas entre éstos y los caracteres con importancia económica.

Aquellos caracteres que se pueden detectar a simple vista, de fácil registro, que tienen alta heredabilidad y alto valor taxonómico y agronómico, constituyen los mejores descriptores de una especie; además tienen la característica de que se pueden aplicar a muestras pequeñas y permiten diferenciar poblaciones (Jaramillo y Baena, 2000).

Una vez evaluada y descripta las poblaciones de inicio, es necesario que se comience con su evaluación en ensayos a campo, que permitan comparar en un mismo ambiente las plantas obtenidas de las poblaciones muestreadas y relevar los caracteres fenotípicos cuantitativos y cualitativos (Ojeda *et al.*; 2015).

En los ensayos a campo debe considerarse el diseño experimental de las parcelas, ya que es importante, mantener la identificación de los diferentes individuos procedentes de cada población y a su vez de las diferentes poblaciones y que todas las procedencias (poblaciones) tengan igual tratamiento. De este modo, los resultados obtenidos permiten cuantificar la variabilidad dentro de las poblaciones y entre éstas, identificando diferencias y seleccionando aquellas plantas que se destaquen por presentar caracteres de interés, para su uso en la producción o en el mejoramiento de cultivos (Ocaño *et al.*, 2015).

Objetivos específicos

- Evaluar la variabilidad morfológica y química de poblaciones de peperina provenientes de distinto origen.
- Generar una población de base genética amplia de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling, mediante la reproducción de plantas provenientes de poblaciones de distinto origen.
- Evaluar en un ciclo de cultivo de una población base la variabilidad en rendimiento vegetativo, tolerancia a virus *Cucumber mosaic virus* (CMV) y rendimiento y composición de aceites esenciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

I- Obtención y caracterización del material de estudio

a) Selección del material de estudio:

En relación a los objetivos propuestos en este trabajo, se tomó como uno de los materiales de partida, poblaciones en cultivo derivadas del cultivar Champaquí-FCA, que se conservaban en el campo escuela de la facultad de Ciencias Agropecuarias-UNC

(Localidad Capilla de los Remedios, Córdoba), en instalaciones del predio de dicha facultad en la Ciudad de Córdoba, y en un campo privado en la Localidad de Alta Gracia, Provincia de Córdoba, Argentina.

Para la obtención de las poblaciones silvestres, se consideraron dos grandes zonas dentro de la provincia de Córdoba donde se distribuye la especie y se realizaron recolecciones de muestras de plantas en base a los datos brindados por recolectores y consumidores locales (informantes clave).

Los muestreos se realizaron en las Localidad de San Jerónimo y Tala Cañada, dentro de la zona denominada de Sierras Grandes y, en la localidad de Salsipuedes, dentro de la zona de Sierras Chicas de la provincia de Córdoba (Argentina). Se determinaron en total 6 áreas de muestreo distribuidas entre las distintas localidades, manteniendo distancias geográficas suficientemente amplias como para disminuir las posibilidades de intercambio gamético entre los individuos muestreados. En la Fig. 2.1 se indican los lugares de recolección dentro de la provincia de Córdoba.

En cada sitio de recolección (tanto poblaciones cultivadas como silvestres) se registraron la longitud, latitud y altitud sobre el nivel del mar por medio de un GPS (Sistema de Posicionamiento Global). Además, se recabó información sobre precipitación media anual y temperaturas medias de los meses de enero y julio desde el Servicio Meteorológico Nacional.

En resumen, el material vegetal utilizado son poblaciones de peperina, provenientes de:

1- Poblaciones derivadas de clones selectos que fueron seleccionados por caracteres morfológicos, fenológicos y de buena respuesta al manejo cultural (Ojeda, 2004).

2- Poblaciones silvestres de las localidades de San Jerónimo y Tala Cañada (Sierras Grandes, Provincia de Córdoba).

3- Poblaciones silvestres de la localidad de Salsipuedes (Sierras Chicas, Provincia de Córdoba).



Figura 2.1. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling “peperina” en áreas de crecimiento espontáneo y en cultivo, dentro de la Provincia de Córdoba, Argentina.

b) Recolección y conservación *ex situ* de germoplasma de las distintas poblaciones de peperina en estudio

Se tomaron muestras de semillas de los distintos lugares de recolección, se identificaron, se limpiaron, deshidrataron y acondicionaron en sobres rotulados y posteriormente se colocaron en bolsas de polipropileno. De esta manera se conservan las semillas a largo plazo procurando el menor contenido de humedad interna posible (de aproximadamente el 6%) y a una temperatura de 18°C bajo cero. Para la conservación a mediano plazo se procedió de forma semejante colocando los sobres en frascos cerrados herméticos en heladera a 4°C.

Material herborizado: Toda la información obtenida de las descripciones de los sitios de recolección, se acompañó con muestras de plantas de cada sitio que fueron ingresadas al Herbario del Museo Botánico de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba; montadas, determinadas y debidamente fichadas, registrándose sus números de herbario como: MO 09, MO 05, MO 17, MO 34, MO 27, MO 12, Sonia Ocaño 16, Sonia Ocaño 18 y Sonia Ocaño 22.

c) Caracterización de poblaciones de peperina para estudio

Caracterización morfológica

Dentro de cada población, se tomaron al azar 30 individuos y se evaluaron las siguientes características por planta, conforme a la metodología citada por Ojeda (Ojeda, 2004).

- Longitud de rama (cm): medición de la longitud de la rama más larga.
- Número de ramas: conteo de ramificaciones primarias.
- Largo de hoja (cm): medido desde la base de la lámina hasta su ápice, en muestras de hojas del tercio central de la rama más larga.
- Ancho de hoja (cm): medido perpendicularmente a lo largo de la misma y considerando su magnitud máxima, en muestras de hojas del tercio central de la rama más larga.
- Índice foliar: relación que describe la forma de la hoja obtenida por el cociente entre el largo y el ancho de la hoja, en muestras de hojas del tercio central de la rama más larga.
- Área foliar (cm²).

Para la determinación de estos parámetros se tomaron hojas completamente expandidas situadas en el tercio medio de la rama más larga, las mismas se pegaron sobre una hoja de papel contact transparente (Figura 2.2) y se escanearon. Para el procesamiento de las imágenes escaneadas se utilizó el programa ImageJ (Rasband, 2002).

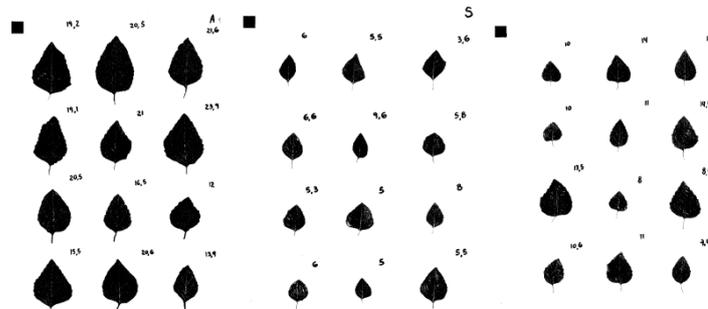


Figura 2.2. Imagen ejemplo de hojas escaneadas para la determinación de los parámetros foliares.

Rendimiento de Aceites esenciales

Para establecer el rendimiento en aceites esenciales, se recolectaron en cada población de estudio, muestras de ramas que se secaron con circulación de aire, en una habitación cerrada y calefaccionada, con una temperatura inferior a 40 °C. Las muestras se constituyeron con flores, hojas y tallos secos, en cada una de las poblaciones. La obtención del aceite esencial se realizó en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba, mediante destilación por arrastre con vapor de agua, en un equipo Clevenger modificado con cámara separada (Fig. 2.3).



Figura 2.3: Destiladores tipo Clevenger utilizados para la extracción del AE de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling “peperina”.

El volumen de AE obtenido de cada muestra fue cuantificado en el recolector graduado del destilador y luego colocado en tubos eppendorf debidamente rotulados. El rendimiento de AE es expresado como mililitros de aceites esenciales cada 100 gramos de materia vegetal seca (ml AE/100gr MS). Para conservar las muestras obtenidas, se deshidrataron mediante el agregado de sulfato de sodio anhidro y se conservaron en freezer a -4°C para su posterior análisis químico.

Caracterización del Aceite esencial (AE):

La caracterización de los AE se realizó mediante un análisis cromatográfico. Dicho análisis químico se realizó por cromatografía gaseosa con espectrómetro de masas (CG/EM) en un equipo Claruss 600 de Perkin Elmer, con el programa

TurboMass 5.4, empleando una columna capilar de sílica fundida Perkin Elmer DB5 MS (60 m de largo; 0,25 mm de diámetro; 0,25 µm de espesor de fase líquida) y helio como gas portador (49,60 psi). La inyección de las muestras fue realizada en modo Split. La ionización se llevó a cabo en el espectrómetro de masas por impacto de electrones con energía de ionización de 70 eV. El análisis se realizó con un programa de temperatura inicial de 60°C (durante 5 minutos), incrementando luego 5°C/minuto hasta llegar a los 240°C que se mantuvieron por 10 minutos. La presión en la cabeza de la columna fue de 15 psi y la temperatura del inyector de 250°C. La línea de transferencia del cromatógrafo gaseoso se mantuvo a 200°C. Los cromatogramas fueron tomados en modo “Scan” escaneando los cuadrupolos de $m/z= 50-300$. Los compuestos fueron identificados por comparación de los índices de retención y sus espectros de masa mediante la biblioteca NIST MS 2.0 y Adams (2007).

Para caracterizar químicamente cada población luego de obtenidos los datos de cromatogramas, se realizaron análisis multivariados agrupando a las poblaciones en función de los compuestos mayoritarios y viceversa. Los resultados se procesaron mediante el programa estadístico InfoStat (InfoStat, 2013).

II- Multiplicación y obtención de plantines

El objetivo de esta etapa del trabajo fue establecer la respuesta de las diferentes poblaciones estudiadas de peperina en la producción de plantines. Así se procedió obtener los plantines para ejecutar el primer ensayo a campo con el propósito de: Generar una población de base genética amplia mediante las plantas seleccionadas de las poblaciones en estudio.

Localización del ensayo

El ensayo se realizó en invernadero ubicado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba.

Germinación y obtención de plantines

De las poblaciones en cultivo, se seleccionaron 30 individuos en cada una de ellas, que no presentaban síntomas de virosis y con un crecimiento destacado frente al

resto de la población, principalmente en cuanto a tamaño de planta (altura de la rama más larga y número de ramas). De las plantas seleccionadas se recolectaron semillas para su multiplicación. En las poblaciones silvestres, se recolectaron semillas de plantas que poseían caracteres organolépticos deseados (aroma y color) según la selección de los informantes claves.

Luego, se procedió a la siembra de más de 300 semillas de cada una de las poblaciones, manteniendo la identificación por población. Se trabajó en bandejas plásticas (spelling de 91 celdas cada una) con un sustrato de tierra negra y vermiculita, en proporción 3:1 respectivamente. Luego se realizó el seguimiento de los plantines. Las labores culturales realizadas posteriormente a la siembra fueron riego por neblina y desmalezado manual.

Plántulas: Cuando las plántulas alcanzaron aproximadamente 5 cm de altura se trasplantaron a macetas de 8,5 cm. de diámetro las que se mantuvieron bajo cubierta.

Plantín: En plántulas de 30 días se realizó una medición de altura determinando el crecimiento por planta en cada una de las poblaciones. Conjuntamente se recolectó una muestra de hojas del tercio medio del eje del plantín en cada una de las poblaciones, para poder determinar largo y ancho de las hojas, índice foliar y área foliar.

Las labores culturales realizadas hasta el momento del trasplante fueron riego y desmalezado.

Análisis estadístico

Mediante el análisis de varianza se establecieron las diferencias entre poblaciones y se realizaron Test de comparación de medias entre las poblaciones.

Las evaluaciones para conocer la variabilidad y el comportamiento de las poblaciones comenzaron desde la producción de plantines a través de los siguientes caracteres:

- Porcentaje de germinación
- Porcentaje de mortandad, anotando las plántulas que después de germinadas morían.

- Porcentaje de mortandad en maceta, anotando plántulas que después de trasplantadas a maceta morían.
- Crecimiento en los primeros 30 días (altura en cm).
- Se tomaron muestras de hojas, seleccionadas al azar del tercio central de la rama (hojas totalmente desarrolladas) y se registraron utilizando el software ImageJ (descrito anteriormente) los siguientes parámetros:
 - Largo de hoja (LH): Medido desde la base de la lámina hasta su ápice.
 - Ancho de hoja (AH): Medido perpendicularmente al largo de la misma y considerando su magnitud máxima.
 - Índice Foliar (LH/AH): Obtenido por el cociente entre largo y ancho de la hoja. (largo/ancho). Relación que da una idea sobre la forma de la hoja.
 - Área foliar (AF) en cm².

III- Evaluación de las poblaciones a campo

En primavera se llevaron los plantines a campo, para la formación de la población base. Se colocaron los plantines en una parcela completamente aleatorizada, donde las plantas provenientes de las poblaciones cultivadas (A1, A2, A3) estuvieron repetidas 3 veces de manera de asegurar el intercambio de polen con las otras poblaciones. A la parcela se le realizaron labores culturales (riegos, carpidas, desmalezado y aporques) para su mantenimiento.

Se realizaron el seguimiento y la evaluación de las plantas a campo teniendo en cuenta las condiciones necesarias para optimizar la producción de semillas.

En otoño se juntaron las semillas de cada planta manteniendo la identificación de planta madre y población de origen. Se conoce que el sistema reproductivo predominante es la alogamia, por lo que las semillas cosechadas de una planta determinada son de madre común y de padre incierto, dando progenies de hermanos completos o de medios hermanos en proporciones no conocidas.

Durante el seguimiento y evaluación de las plantas a campo en cultivo, se analizaron los siguientes caracteres cualitativos y cuantitativos definidos en base a las experiencias de cultivo preliminares durante la obtención del cultivar Champaqui-FCA

(Ojeda, 2004). Todos los caracteres se midieron en plena floración, estadio donde la planta cesa su crecimiento. Las mediciones de peso se realizaron a posterior de la cosecha.

Caracteres cuantitativos:

- Altura inicial (cm): Medición de la altura de plantín al momento de trasplante a campo.
- Altura final (cm): Altura de la planta desde la base hasta el extremo distal, en la rama más larga. Medición realizada previa a la cosecha de las plantas.
- Número de ramas (N°R)
- Peso Fresco en gramos (PF): Peso total de la planta al momento de cosecha.
- Peso Seco en gramos (PS): Peso seco constante de la planta completa luego de secada.

Caracteres cualitativos:

- Estructura de planta: definida por la forma del follaje y la posición de las ramas como: Planta Erecta o Planta rastrera.
- Síntoma de virosis *CMV*: Presencia o ausencia de síntomas.

Cosecha y post cosecha

Cada planta fue cosechada individualmente, manteniendo su identificación. La cosecha se realizó en plena floración que es el período de mayor rendimiento del AE (Muñoz, 2000). El corte de la planta se realizó a 20 cm del suelo. El ensayo se dejó de regar 3 días antes de la cosecha para que las plantas concentren el AE y tengan menor humedad, para favorecer un mejor secado.

Cada planta cosechada fue pesada (PF= peso fresco) y luego se la colocó en bolsa de papel manteniendo su identificación. Las bolsas se almacenaron en una habitación techada y ventilada, secándose a temperatura ambiente siguiendo la metodología descrita por Muñoz (2000) para especies aromáticas. Una vez que las plantas estuvieron deshidratadas se las pesó nuevamente registrándose el peso seco

(PS). Las semillas de cada planta fueron almacenadas en bolsas de papel con la correspondiente identificación.

Obtención del aceite esencial:

El material vegetal seco de cada una de las plantas fue destilado individualmente para la extracción del AE y su cuantificación. La destilación se realizó por arrastre de vapor de agua en equipo Clevenger modificado, con cámara de extracción separada. El material vegetal destilado consistió en flores, hojas y tallos secos.

Las muestras de AE se deshidrataron mediante el agregado de sulfato de sodio anhidro y se conservaron en freezer (-4 °C). El AE obtenido fue cuantificado para expresar rendimiento, definiéndose una nueva variable cuantitativa:

- Rendimiento de AE= (ml AE/100 g material vegetal seco)

Identificación de la población selecta

Se utilizó el método de selección independiente (Cubero, 2003) adaptado para seleccionar individuos que presentaron de manera simultánea todas las características deseadas. En base a resultados preliminares (Ojeda, 2004) se definieron como criterio de selección los caracteres altura de planta (Alt.), peso fresco (PF) y área foliar (AF). Para establecer el límite inferior de cada carácter del criterio de selección se consideró el valor medio de todos los individuos derivados de las poblaciones del cultivar Champaqui-FCA. El criterio para definir la población selecta quedó conformado de la siguiente manera:

$$\mathbf{Individuo\ Selecto = Alt. (\geq \bar{X}) + PF (\geq \bar{X}) + AF (\geq \bar{X})}$$

Las plantas de la población de base genética amplia que cumplieron con el criterio de selección constituyeron la población selecta (subgrupo de la población de base genética amplia). Luego, cada una de estas plantas selectas fue trasplantada a maceta y llevadas a invernadero para poder extraer esquejes y realizar su multiplicación en forma asexual para su uso en ensayos posteriores.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

I- Obtención y caracterización del material de estudio

a) Selección del material de estudio:

En la Tabla 2.1 se presenta la ubicación geográfica de cada una de las poblaciones en estudio.

Tabla 2.1: Ubicación geográfica, temperatura y precipitaciones de 9 sitios de recolección de poblaciones silvestres y en cultivo de “peperina”, *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling, en la provincia de Córdoba, Argentina.

Zona y Tipo de población	Localidad	Población	Latitud	Longitud	Altitud msnm	Temperatura media °C		Precipitación media anual mm
						Enero	Julio	
Sierras Grandes Silvestre	San Jerónimo	L1	31°20'02"	64°55'51"	1477	23,4	9,5	700
Sierras Grandes Silvestre	San Jerónimo	L2	31°20'26"	64°55'26"	1542	22,6	10,4	608
Sierras Grandes Silvestre	Tala Cañada	L3	31°21'32"	64°57'48"	1270	21,5	9,3	640
Sierras Chicas Silvestre	Salsipuedes	S1	31°06'58"	64°17'14"	723	22,5	9,3	700
Sierras Chicas Silvestre	Salsipuedes	S2	31°07'15"	64°17'53"	763	22,6	9,3	660
Sierras Chicas Silvestre	Salsipuedes	S3	31°06'58"	64°18'15"	773	21,9	9,2	1300
Capital y Alrededores Cultivada	Alta Gracia	A1	31°38'12"	64°26'16"	588	26,2	14,5	1100
Capital y Alrededores Cultivada	Capilla de los Remedios	A2	31°29'01"	64°00'23"	371	25,4	11,8	650
Capital y Alrededores Cultivada	Capital	A3	31°26'24"	64°11'06"	438	28,4	16,3	800

A través de un análisis de componentes principales incluyendo como variables la latitud (Lat), longitud (Long), altitud (Alt), temperaturas medias de enero (Tm E), temperatura media de julio (Tm J) y precipitación media anual (ppma), se encontró que existe variabilidad entre los ambientes donde crecían las poblaciones recolectadas (Fig. 2.4). El 78% de la variabilidad total pudo ser explicada por los 2 primeros ejes o componentes principales que forman el plano de la Fig. 2.4. La variabilidad ambiental entre las áreas de ubicación de las poblaciones es explicada principalmente por la Altitud y la Longitud, variables que correlacionaron negativamente con la Latitud ya

que localidades con mayor Latitud, presentan menor Altitud y se posicionan a menor longitud que las restantes.

La segunda componente principal marca variabilidad dentro de cada uno de los grupos de localidades establecidos, debido principalmente a la altitud y a las temperaturas medias. Según se observa en la Tabla 2.1, entre las localidades situadas a la derecha del eje 1, A2 se diferencia de A1 por tener menor Latitud y menos temperaturas medias de enero, mientras que entre áreas situadas a la izquierda del eje 1, las poblaciones S1, S2 y S3 se separan de las poblaciones L1, L2 y L3 por tener menor Longitud.

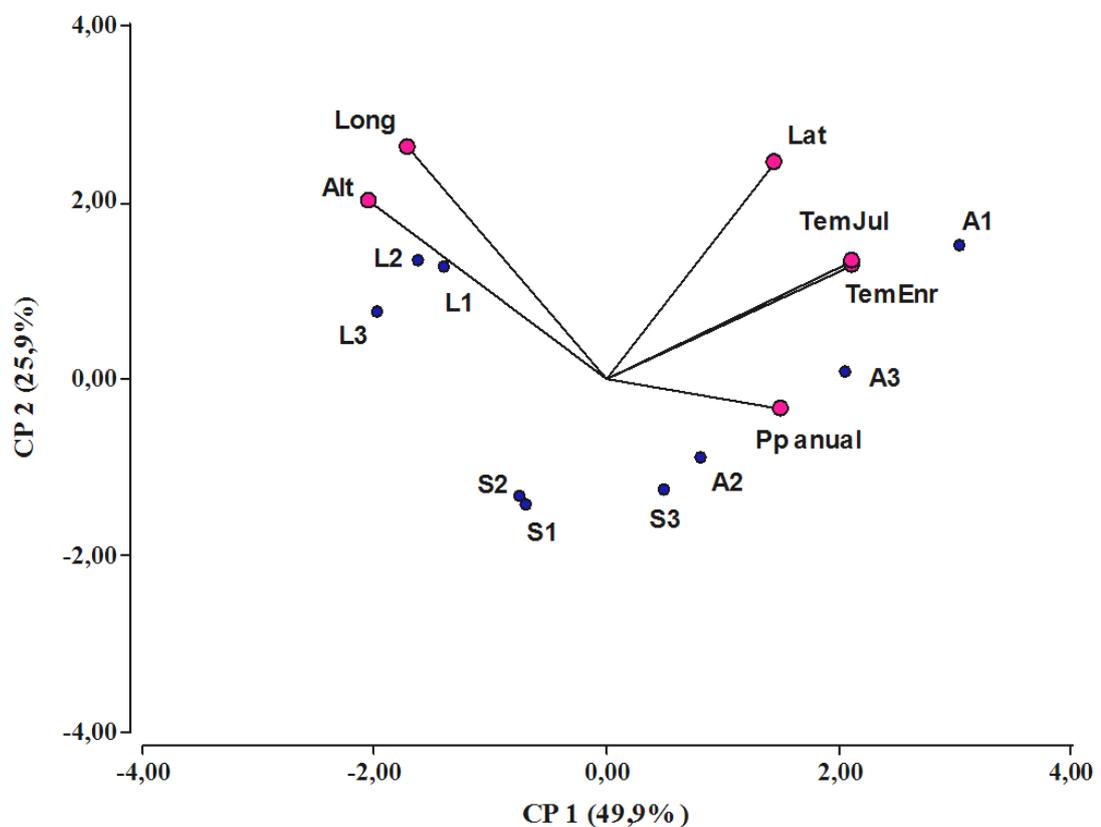


Figura 2.4. Variabilidad de 9 poblaciones de *Minthostachys verticillata* “peperina” en estudio según los dos primeros ejes de un Análisis de Componentes Principales basados en caracteres geográficos y climáticos. (Alt: altitud, Long: longitud, Lat: latitud, Tm J: temperatura media de Julio, Tm E: temperatura media de Enero, pp m a: precipitación media anual)

La distribución de plantas fue de grupos o demos, variando el número de plantas en cada uno de ellos, pero en general no superando un número de 10 plantas por demo.

Una característica observada en los sitios donde se encuentran las peperinas silvestres es que en general están bajo algún árbol o arbusto y a la sombra. El espacio de esa protección es pequeño por ello no pueden crecer muchas plantas en el mismo lugar.

En Tala Cañada y San Jerónimo la mayoría de las plantas se encontraban en forma aislada, posiblemente debido a que en esos lugares la presión de extracción por parte de los recolectores es muy grande. Ambas áreas son reconocidas como zonas de explotación del recurso (Bustos *et al.*; 2005).

En todos los lugares donde se recolectó peperina ésta crece en la ladera sur, lo que se condice con la hipótesis propuesta por Ojeda (2004) de que la planta busca protección para no estar expuesta a la radiación directa del sol. Por lo general, se la encontró en suelos pedregosos, sueltos y con una capa de hojarasca natural, característica que favorece su sistema radical superficial.

b) Recolección y conservación *ex situ* de germoplasma de las distintas poblaciones de peperina en estudio

Los sistemas de conservación *ex situ* surgen como una medida complementaria a las estrategias de conservación *in situ*, para la preservación de especies vulnerables, sujeta a procesos de erosión genética. La conservación *ex situ* se refiere al mantenimiento de los individuos fuera de su hábitat natural, una de las formas es a través de bancos de germoplasma. En este caso las semillas se pueden conservar durante diferentes períodos, largo, mediano y corto plazo (Benítez, 2001). Se aconseja que las semillas almacenadas a largo plazo sean conservadas en recipientes cerrados al vacío, con un contenido de humedad interna de aproximadamente el 6% y a una temperatura de 18°C bajo cero. Según Roberts y Ellis (1977), estas condiciones permiten mantener una buena viabilidad de las semillas durante muchos años. Para su conservación en condiciones de mediano plazo las muestras acondicionadas de la misma forma, se mantienen a temperaturas de alrededor de 4°C, debiendo ser renovadas, mediante el cultivo, al cabo de 4 a 10 años de almacenamiento, según la especie.

En este caso, las semillas obtenidas en los distintos lugares de recolección se identificaron, se limpiaron, deshidrataron y acondicionaron en sobres rotulados dentro

de bolsas de polipropileno, y son conservadas a largo plazo en una heladera con freezer en instalaciones de la Facultad de Ciencias Agropecuarias-UNC.

c) Caracterización de poblaciones de peperina para estudio

Caracterización morfológica:

Las variables evaluadas en esta etapa para cada una de las poblaciones fueron: Ancho de Hoja (A), Largo de Hoja (L), Relación L/A de hoja, Área foliar, Altura de la rama más larga (Alt), Número de ramas y Rendimiento de Aceites Esenciales (Rto. AE).

De cada una de las poblaciones muestreadas se analizaron 30 individuos. En la Tabla 2.2 se presentan los caracteres evaluados mediante los valores medios, encontrándose diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) entre las poblaciones.

Tabla 2.2: Diferenciación de 9 poblaciones de peperina (*Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling), mediante los valores medios de los caracteres morfológicos y rendimiento de aceites esenciales evaluados.

Pob.	Altura rama más larga (cm)		Número de ramas	Largo de hoja (cm)		Medidas de Hoja		Índice foliar L/A	Área foliar (cm ²)	Rto. AE (ml/100grMS)				
						Ancho de hoja (cm)								
A1	104,3	e	39,17	d	3,98	d	2,69	c	1,50	a	6,90	c	0,91	b
A2	58,50	bcd	32,53	cd	3,45	c	2,13	b	1,65	ab	4,64	b	0,87	b
A3	59,53	cd	26,67	bc	3,52	c	2,19	b	1,65	ab	4,98	b	0,71	a
S1	52,57	bc	17,27	ab	1,79	ab	0,96	a	1,95	ab	0,98	a	1,85	e
S2	67,43	d	15,03	a	1,77	ab	0,92	a	1,84	ab	0,92	a	1,19	c
S3	43,80	b	16,53	a	1,78	ab	0,89	a	1,68	ab	0,84	a	1,32	d
L1	25,10	a	18,30	ab	1,96	ab	1,05	a	2,59	b	1,29	a	5,34	h
L2	22,60	a	19,00	ab	1,99	ab	1,06	a	2,24	ab	1,12	a	4,81	g
L3	23,83	a	20,37	ab	1,66	a	0,94	a	1,67	ab	0,84	a	3,75	f

Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha = 0,05$; prueba LSD Fisher).

La media de las poblaciones para el carácter altura de rama más larga, se encuentra dentro de los valores ya mencionados por Ojeda (2004), Epling (1939); Dimitri (1972); Soraru y Bandoni (1978); Gupta (1995). Es de destacar que, en el total de plantas evaluadas, se encontraron algunas con valores cercanos a 30 cm y otras con ramas que alcanzaron más de 100 cm de largo. Las plantas con ramas más largas fueron observadas entre las poblaciones derivadas del cultivar Champaqui-FCA (poblaciones

A1, A2, A3), seguidas por las poblaciones S2, S1 y S3. Se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) entre las poblaciones (Tabla 2.2).

En cuanto al número de ramificaciones, se encontraron porcentajes de ramificaciones muy variables. Se midieron, en algunas poblaciones, plantas con muy pocas ramificaciones y por el contrario, otras con más de 20 ramas. La población A1 que a su vez fue la que se caracterizó por poseer plantas de mayor altura, mostró el mayor número de ramificaciones. Las poblaciones S2 y S3 se diferenciaron por ser las de menor número de ramas, sin embargo presentaron valores altos para altura de la rama más larga.

En cuanto a los parámetros foliares, las diferencias fueron altamente significativas entre las poblaciones derivadas del cultivar Champaqui-FCA y las poblaciones silvestres.

El carácter largo de hoja (LH) para las poblaciones A1, A2 y A3 superó los límites citados para la especie en la bibliografía; sin embargo, estos valores estuvieron de acuerdo a los valores que describen al cultivar (valor medio del LH: 3,3 cm, cultivar Champaquí-FCA).

Para el carácter ancho de hoja (AH) se observaron en las poblaciones en cultivo valores medios superiores (entre 2,19 y 2,69 cm) a los descritos para el cultivar Champaqui-FCA, cuyo valor medio es de 1,84 cm mientras que el resto de las poblaciones no mostraron diferencias entre ellas en este parámetro.

El índice entre largo/ancho de hoja (L/A), se consideró como un indicador de la forma, valores mayores sugieren hojas lanceoladas, presentándose estos valores más altos en las poblaciones L1, L2 y L3 ubicadas en las Sierras grandes de la provincia de Córdoba. Este carácter presentó diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre poblaciones, diferenciándose la población L1 del resto de las poblaciones por presentar hojas sustancialmente más largas que anchas.

El carácter área foliar (AF) mostró también diferencias significativas, separándose notablemente, por sus valores más altos, las poblaciones en cultivo, en

contraste a las poblaciones silvestres, que no mostraron diferencias significativas entre ellas (Tabla 2.2).

Rendimiento de aceites esenciales (AE):

Se calcula el rendimiento como: volumen de aceite esencial / 100 gr. de materia seca (ml AE/100 gr. MS).

El rendimiento de aceites esenciales presentó diferencias significativas entre las poblaciones (Tabla 2.2). Los mayores valores se observaron en la población L1 de la localidad de San Jerónimo, la cual se diferencia notablemente de las restantes siendo la de mayor producción de aceite esencial cada 100 gr. de materia seca con 5,34 ml/100gr.PS (Fig.2.5).

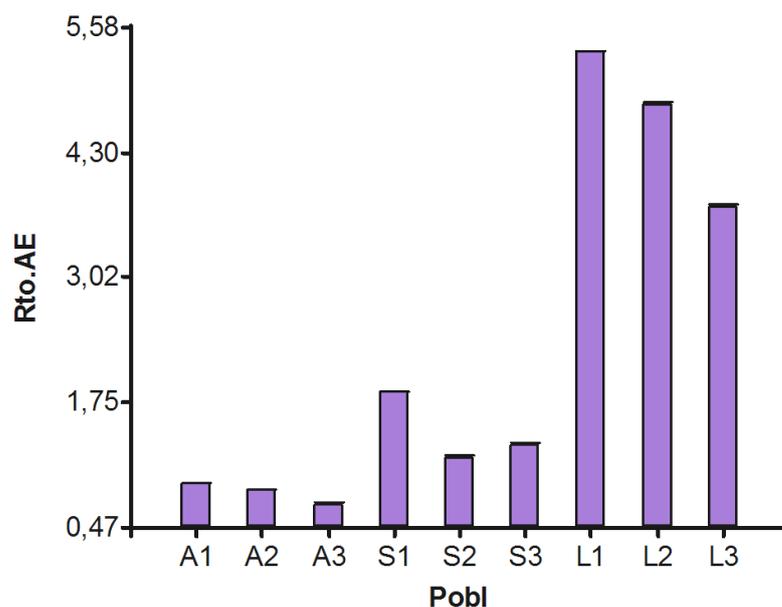


Figura 2.5: Comparación del rendimiento en ml de aceites esenciales entre las poblaciones iniciales.

Caracterización del aceite esencial (AE):

Los componentes característicos del aceite esencial de la peperina, son principalmente mentona y pulegona, y posee además pequeñas cantidades de otros

compuestos como ser isomentona y limoneno (Retamar y Mazzola, 1963; Pomar, 1993; Retamar, 1988; Retamar *et al.*, 1996; Zygadlo *et al.*, 1996).

Coincidiendo con la bibliografía que describe este aspecto, las muestras destiladas presentaron los compuestos mayoritarios, mentona y pulegona en distintas proporciones según las poblaciones. Aquí se presenta el dato de porcentaje dentro del total de AE que representan estos dos compuestos mayoritarios juntos, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones, como puede observarse en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3: Porcentajes de mentona y pulegona en aceites esenciales extraídos de 9 poblaciones de peperina (*Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling) bajo estudio.

Población	Mentona %	Pulegona%	M+P %
A1	20,4 d	41,1 f	61,4 e
A2	17,2 b	32,1 d	49,2 d
A3	27,46 e	43,07 g	70,53 g
S1	27,5 c	63,7 a	91,2 b
S2	29,5 b	44,4 c	73,9 c
S3	32,1 a	35,6 b	67,7 a
L1	19,43 e	4,74 i	24,17 i
L2	17,26 f	8,76 h	26,02 h
L3	12,9 g	7,55 e	20,45 f

M+P: Mentona mas pulegona en %. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha= 0,05$). Test DGC.

En estudios donde se analizaron muestras recolectadas *in situ* de distintas poblaciones de peperina, se encontraron grandes variaciones en cuanto a la composición de aceites esenciales, principalmente en la relación mentona-pulegona; y posteriormente se observó que esa misma variabilidad se mantiene cuando esas muestras fueron cultivadas en un mismo ambiente *ex situ* (Ojeda, 2004).

La mentona es un compuesto que se forma por procesos oxidativos de la pulegona, por lo que a medida que transcurre el ciclo vegetativo de la planta se producen estos cambios, pasando de pulegona producida a mentona. En relación a esto,

en distintos ensayos realizados, pudo observarse que algo semejante ocurre con los cortes que provocan estrés en la planta y por consecuencia aumenta la proporción de mentona (Banchio *et al.*; 2002). También hay estudios que evalúan la composición de aceites esenciales frente al estrés producido por el ataque de insectos del tipo “minador de hojas”; mostrando estos perfiles un aumento en la concentración de pulegona (componente tóxico) después del daño del minador (Zygadlo *et al.*, 2005).

Es importante la relación entre los dos compuestos principales del aceite esencial de la peperina, ya que una alta proporción de uno de ellos en desmedro del otro dará o no el aroma típico por el que se la conoce principalmente en Córdoba; siendo de menor o mayor preferencia para el consumidor tradicional; como se evaluará en el capítulo 4 de este trabajo.

Los aceites esenciales evaluados estuvieron constituidos en su mayor proporción por mentona y pulegona, encontrándose esta última en mayor proporción, con excepción de las poblaciones ubicadas en las Sierras Grandes de la provincia de Córdoba (L1, L2 y L3), donde este compuesto se encontró en menor proporción en relación a mentona (Tablas 2.3). La variación observada entre poblaciones, en el porcentaje de mentona, de pulegona y de mentona más pulegona, fue significativamente distinto de cero ($P \leq 0,05$).

El análisis de componentes principales (Fig. 2.6), incluyendo como variables a la altura de planta, número de ramificaciones, parámetros foliares (largo, ancho, índice L/A y área foliar) y las proporciones de los principales aceites esenciales (mentona, pulegona y mentona más pulegona), sugirió que existe variabilidad morfológica y bioquímica entre las poblaciones analizadas. El 85,6% de esta variabilidad es explicada por los 2 primeros ejes o componentes principales. La primera componente principal explica el 53,1% de la variabilidad de las poblaciones cultivadas respecto a las restantes; contribuyendo a esta variación, fundamentalmente los caracteres morfológicos. En la segunda componente principal (32,5%) las variables que más aportaron en la explicación de la variación fueron las relacionadas a las proporciones de los componentes mayoritarios de sus aceites esenciales, distinguiendo a las poblaciones silvestres L1, L2 y L3 de las restantes.

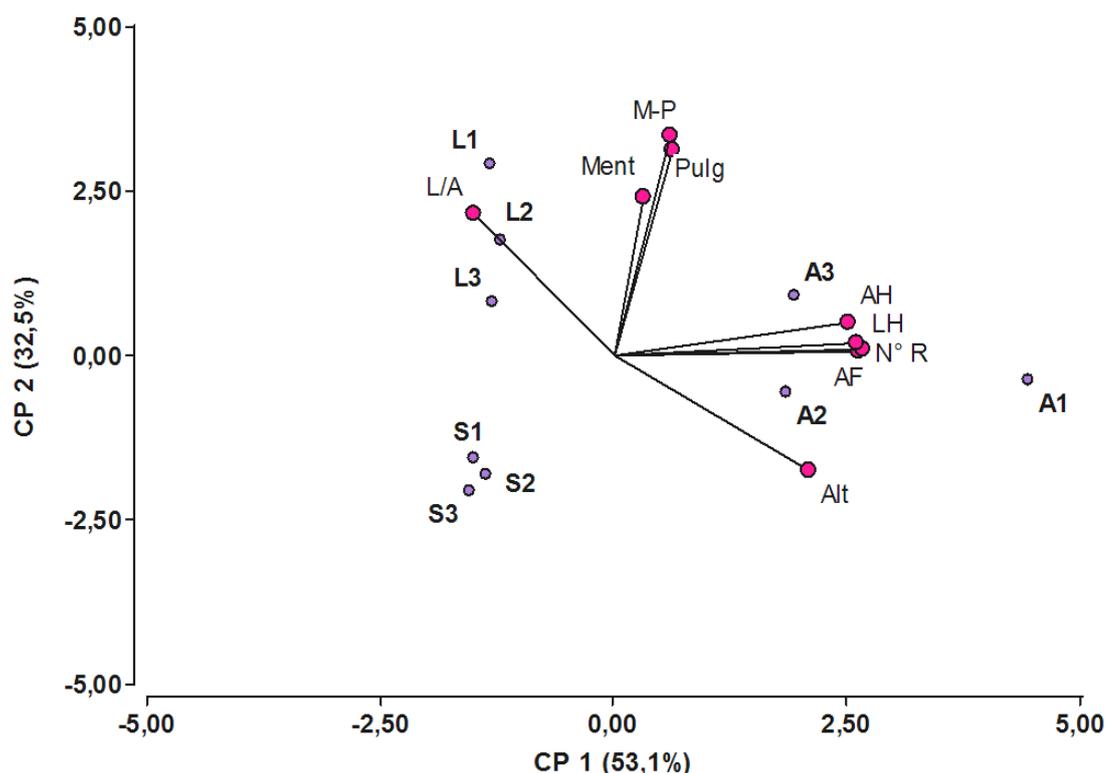


Figura 2.6: Variabilidad de 9 poblaciones de peperina (*Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling) en relación a caracteres morfológicos y bioquímicos de plantas según las 2 primeras componentes de un Análisis de Componentes Principales.

Se realizó un análisis de conglomerados (Fig. 2.7), utilizando el algoritmo encadenamiento promedio con distancias euclídeas entre datos previamente estandarizados y considerando como variables para determinar la semejanza entre poblaciones a aquellas de mayor relevancia para explicar variabilidad según indican los Análisis de Componentes Principales: altitud, longitud, temperaturas medias, contenido de mentona y pulegona en las plantas, largo de las hojas, número de ramas y rendimiento de aceite esencial. A través de este análisis se pudo diferenciar dos grupos de poblaciones, las poblaciones derivadas de cultivos y las poblaciones silvestres. En el grupo de las poblaciones silvestres a su vez se detectan diferencias entre las tres poblaciones de las Sierras grandes y las tres poblaciones de Sierras Chicas ya que las distancias entre ellas fueron grandes. En las poblaciones derivadas de cultivos también se diferencian A2 y A3 (Capilla de los Remedios y Ciudad de Córdoba, respectivamente) de la población A1 de Alta Gracia, asumiendo que existe una respuesta de las poblaciones al medio en el que crecen. Por este motivo podemos

considerar que las diferencias poblacionales encontradas pueden estar identificando distintos ecotipos.

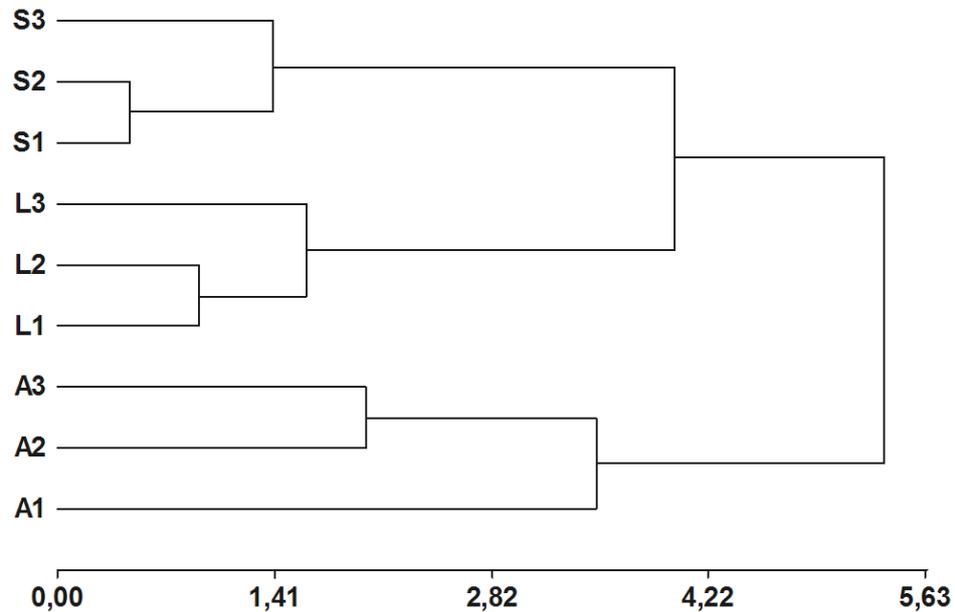


Figura 2.7: Dendrograma del agrupamiento de 9 poblaciones de peperina (*Menthostachys verticillata* (Griseb.) Epling), generado a partir de caracteres descriptores del ambiente y de las plantas. Correlación cofenética 0,921.

II- Multiplicación y obtención de plantines

Luego de la selección y caracterización de las poblaciones de peperina para ser estudiadas y utilizadas en el proyecto, el objetivo siguiente fue la generación de una población base de genética amplia, obtenida a partir de las poblaciones silvestres (S1, S2, S3, L1, L2, L3) y las poblaciones derivadas del cultivar de peperina llamado Champaquí-FCA, (A1, A2, A3).

La evaluación se realizó a través de los caracteres: Porcentaje de germinación, Porcentaje de mortandad, Porcentaje de mortandad en maceta y Crecimiento a los 30 días (cm). Los caracteres morfológicos foliares evaluados fueron largo, ancho, relación largo-ancho y superficie de la hoja.

El análisis estadístico de cada uno de estos caracteres determinó la existencia de diferencias significativas ($\alpha= 0,05$), excepto para el índice foliar, relación largo/ancho de hoja, lo cual pone en evidencia la existencia de variabilidad entre las poblaciones (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Valores medios para cada una de las variables medidas en los individuos evaluados, de acuerdo a su origen.

Población	% 7 días ¹	%15 días ¹	% 20 días ¹	Altura plantín ³	Largo de hoja ²	Ancho hoja ²	L/A de hoja ²	Área foliar ²
A1	12,82 ab	24,17 a	59,71 a	18,69 f	4,79 d	3,01 d	1,60 a	8,16 d
A2	10,99 ab	31,50 ab	65,93 a	13,33 de	4,39 d	2,63 cd	1,68 a	6,38 cd
A3	11,35 ab	37,73 abc	63,01 a	14,68 e	4,12 cd	2,42 bc	1,75 a	5,52 bc
S1	5,86 a	33,70 ab	64,10 a	5,99 a	2,76 a	1,68 a	1,66 a	2,48 a
S2	10,26 ab	41,39 ab	65,93 a	6,59 ab	2,95 a	1,83 a	1,64 a	3,00 a
S3	12,45 ab	32,60 bc	64,47 a	7,37 ab	3,02 ab	1,85 a	1,65 a	2,92 a
L1	15,38 ab	51,28 c	70,70 ab	11,17 cd	3,65 bc	2,04 ab	1,81 a	3,80 ab
L2	20,88 b	41,02 bc	78,39 b	10,89 cd	3,11 ab	1,96 ab	1,60 a	3,31 a
L3	16,48 ab	44,69 bc	69,97 ab	9,31 bc	3,24 ab	1,96 ab	1,69 a	3,43 a

1- % Germinación a los 7, 15 y 20 días de sembrados; 2- Parámetros foliares; 3-Altura plantín= Altura del plantín en cm a los 30 días. Letras distintas indican diferencias significativas ($P\leq 0.05$). Test DGC.

Germinación

La siembra en placas speedling (de 7x13 orificios), ubicando una semilla por celda, permitió determinar perfectamente el porcentaje de germinación por población y continuar las observaciones para establecer el porcentaje de mortandad de las plántulas dentro de sus primeros días de vida.

Se lograron porcentajes de germinación elevados ya que alcanzaron hasta el 82%. Para las distintas poblaciones se observaron diferencias entre los primeros días de la germinación y después de transcurridos los 15 días de la misma (Fig. 2.8); en todos los casos hay un marcado aumento después del día 15. Por tal razón se considera que no es necesario realizar tratamientos para la germinación ya que sin ellos se lograron elevados porcentajes. Cabe aclarar que las semillas utilizadas fueron cosecha del mismo año.

En la evaluación del poder germinativo, no se observan diferencias significativas entre las poblaciones.

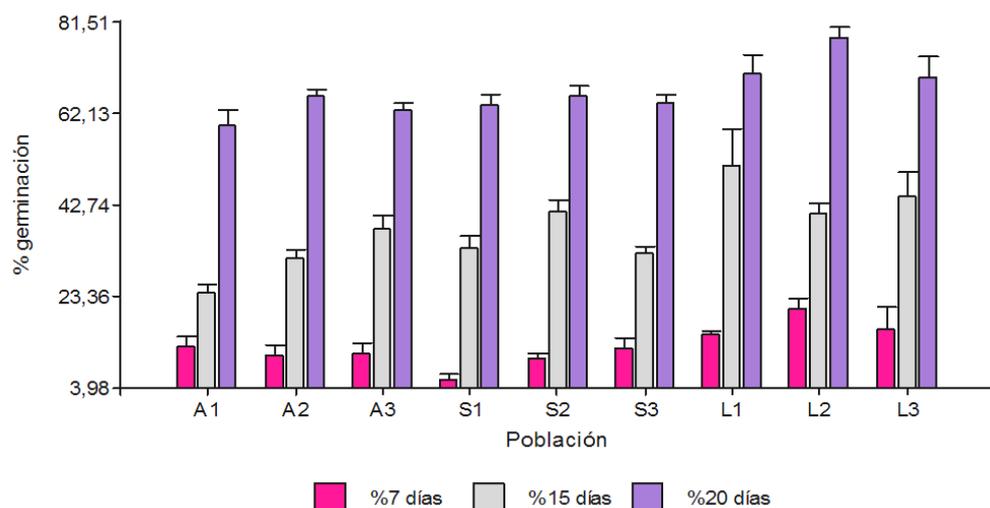


Figura 2.8: Comparación de los valores medios de porcentajes de germinación entre Poblaciones: Población de Alta Gracia (A1), Población de Capilla de los Remedios (A2), Población de Ciudad de Córdoba (A2), Poblaciones de Salsipuedes (S1, S2 y S3), Poblaciones de San Jerónimo (L1 y L2) y Población de Tala Cañada (L3); a 7, 15 y 21 días desde la siembra

Mortandad de plántulas

Para mortandad de plántulas, se registraron las plántulas que después de germinadas morían. Los valores obtenidos, fueron prácticamente nulos. Sólo en la Población A1 proveniente de Alta Gracia se registraron 5 plántulas muertas después de su emergencia. Es decir, de un total de 177 plántulas obtenidas de dicha población, murieron el 2,82%.

En las poblaciones restantes no hubo mortandad de plántulas. Todas las plántulas obtenidas sobrevivieron hasta el trasplante a maceta.

Mortandad en maceta

Para mortandad de plántulas en maceta, se registraron las plántulas que morían después de trasplantadas a maceta. En este caso, sólo en la Población S2 de Salsipuedes de un total de 183 plántulas obtenidas, murieron el 1,093%. En las poblaciones restantes no hubo mortandad de plántulas.

Altura de Plantín

En cuanto a este carácter las plantas de la población de Alta Gracia (A1) se diferenciaron significativamente del resto presentando una media de 18,69 cm de crecimiento en altura. La población de Capital (A3) encabeza un segundo rango con un crecimiento inferior, siendo de 14,68 cm mientras que las poblaciones de Salsipuedes (S1, S2 y S3) son las de menor crecimiento de altura como se observa en la Fig. 2.9.

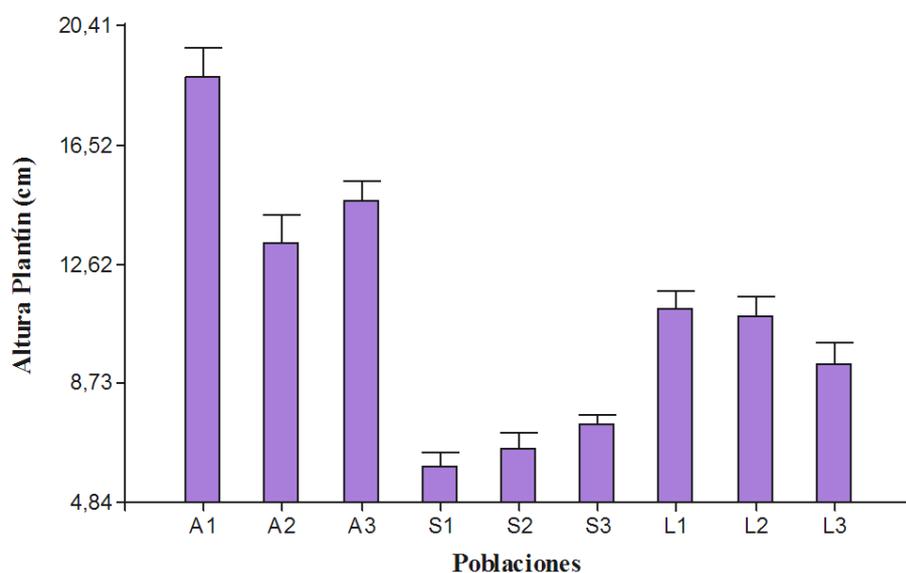


Figura 2.9: Comparación de la altura media de plantín de 30 días entre poblaciones: Población Alta Gracia (A1), Población Capilla de los Remedios (A2), Población Capital (A3), Poblaciones de Salsipuedes (S1, S2 y S3), Poblaciones de San Jerónimo (L1 y L2) y Población de Tala Cañada (L3).

Parámetros Foliare

Los caracteres morfológicos foliares evaluados fueron largo, ancho, relación largo-ancho y superficie de la hoja. El análisis estadístico de cada uno de estos caracteres determinó la existencia de diferencias significativas entre poblaciones, excepto para la relación largo/ancho de hoja (índice foliar).

Para el largo de hoja (medido desde la base de la lámina hasta su ápice) las Poblaciones A1 y A2 presentaron los mayores valores (4,79 y 4,39 cm

respectivamente), siendo este carácter significativamente diferente entre las poblaciones evaluadas (Tabla 2.4 y Fig. 2.10).

El ancho de hoja fue superior en la población de A1 de Alta Gracia, con un valor medio de 3,01 cm., mostrando diferencias significativas con respecto a las otras poblaciones.

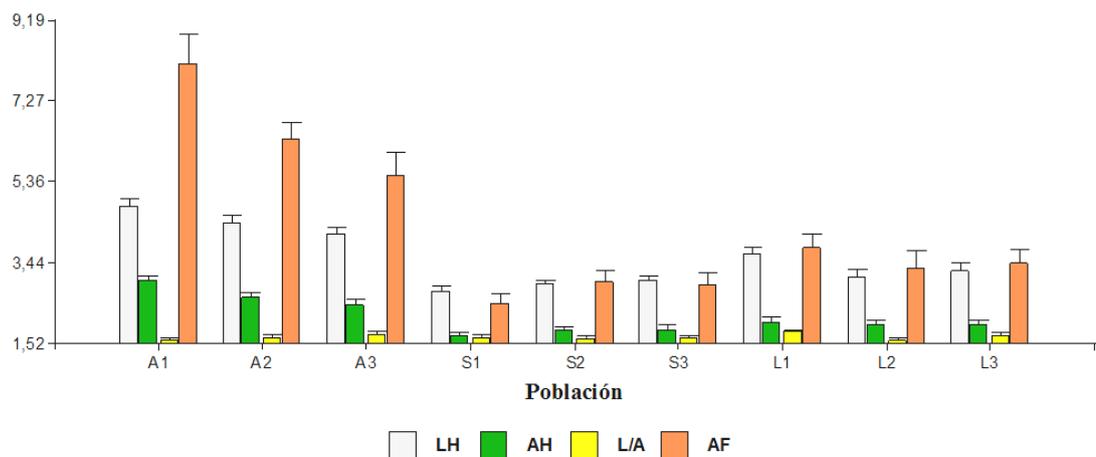


Figura 2.10: Comparación de parámetros foliares entre muestras de distintas poblaciones. Largo de hoja (LH), Ancho de hoja (AH), Índice foliar largo/ancho (L/A) y área foliar (AF).

El índice Largo/ancho de hoja es la relación que da una idea sobre la forma de la hoja. Este análisis no mostró diferencias significativas entre las poblaciones.

En áreas foliares el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre las poblaciones, destacándose las poblaciones derivadas del cultivar Champaqui-FCA frente al resto. La población A1 de Alta Gracia presentó un valor de 8,16 cm², seguida de las poblaciones A2, A3 y L1 con 6,38 cm², 5,52 cm² y 3,80 cm² respectivamente (Fig. 2.10).

III- Evaluación de las poblaciones a campo

En primavera se llevaron los plantines a campo en una parcela completamente aleatorizada, con una distancia de plantación de 0,70 m entre surcos y 0,50 m entre plantas dentro del surco (Fig. 2.11). Los individuos fueron evaluados para observar su comportamiento a campo y si las diferencias que mostraban en la etapa de plantín se seguían manteniendo.



Figura 2.11: Ensayo a campo: 1) Trasplante de los plantines a campo. 2) Ensayo al segundo mes de implantado a campo y 3) Cultivo durante el inicio de la floración.

Las variables evaluadas en esta etapa fueron: Altura al momento de trasplante (Alt Plan), Altura de la rama más larga al momento de cosecha (Alt Cos), Peso fresco al momento de cosecha (PF), Peso seco, midiendo el peso hasta obtener el peso seco constante (PS), Estructura de planta, Presencia de síntomas de virosis y Rendimiento de Aceites Esenciales (Rto. AE). En la Tabla 2.5, se muestran las medidas de resumen para cada una de estas variables evaluadas.

Tabla 2.5: Medidas de resumen para cada una de las variables evaluadas en la población base.

Variable	Media	D.E.	CV	Mín.	Máx.
Altura plantín	10,89	4,55	41,75	3,60	23,90
Nº Ramas (NºR)	23,77	19,31	81,25	9,00	122,00
Altura Cosecha	72,94	29,57	40,54	13,00	150,00
Peso Fresco (PF)	151,87	204,04	134,35	2,00	902,00
Peso Seco (PS)	67,54	82,14	121,63	2,00	370,00
Rto.AE	1,81	1,24	68,38	0,36	4,92

De todas las plantas evaluadas, ninguna manifestó presencia de virosis, tanto en la etapa de plantín como en la etapa a campo. Además el porte o estructura de planta fue en todos los casos del tipo erecta.

Al estudiar la variación entre caracteres y el origen de cada individuo, se determinaron las agrupaciones de los mismos en relación a los caracteres evaluados. Al realizar un análisis de cluster (Fig. 2.12) teniendo en cuenta todas las variables, se observa que los individuos pertenecientes a las poblaciones derivadas del Cultivar Champaquí- FCA (A1, A2 y A3) son más parecidos entre sí. Por otra parte se encuentran los individuos pertenecientes a las 6 poblaciones restantes que se corresponden con las poblaciones derivadas de individuos silvestres.

Frente a un análisis multivariado de componentes principales, se observa (Fig. 2.13) que los dos primeros ejes explican el 87,6 % de la variación existente. El rendimiento de aceites esenciales (Rto. AE) se separa claramente del resto de las variables, y entre las poblaciones se produce la separación de A1, A2 y A3 de las demás, esta última separación coincide con los grupos realizados en el análisis de conglomerados.

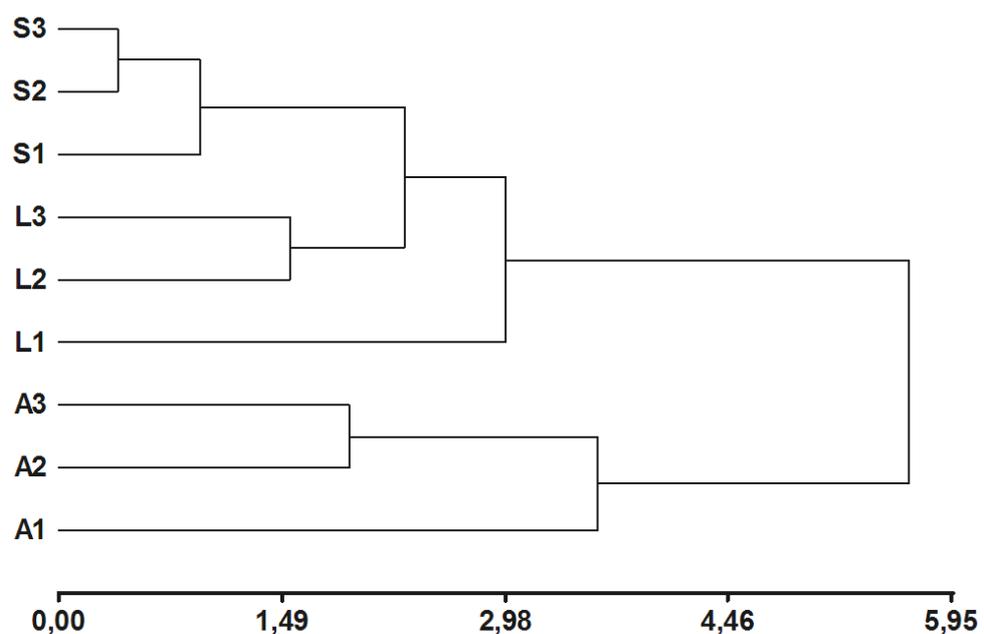


Figura 2.12: Análisis de conglomerados con todos los caracteres evaluados entre los individuos de la población base. Correlación cofenética: 0,897.

En base a estos resultados, se puede observar que los individuos se distinguen en dos grupos: El grupo de los derivados de las poblaciones A1, A2 y A3 que se asocian con las variables morfológicas foliares y rendimiento en materia vegetal; y por otra parte el resto de los individuos que se distinguen por la variable Rto.AE, siendo los que provienen de la población L1 los que muestran un mayor rendimiento.

En otoño se juntaron las semillas de cada planta manteniendo la identificación de planta madre y población de origen.

Teniendo en cuenta estos caracteres evaluados, se eligieron para sembrar y multiplicar en la etapa siguiente, sólo los individuos que superan los valores medios de los individuos derivados del cultivar Champaqui-FCA según el índice propuesto en párrafos anteriores.

$$\text{Individuo Selecto} = \text{Alt.} (\geq \bar{X}) + \text{PF} (\geq \bar{X}) + \text{AF} (\geq \bar{X})$$

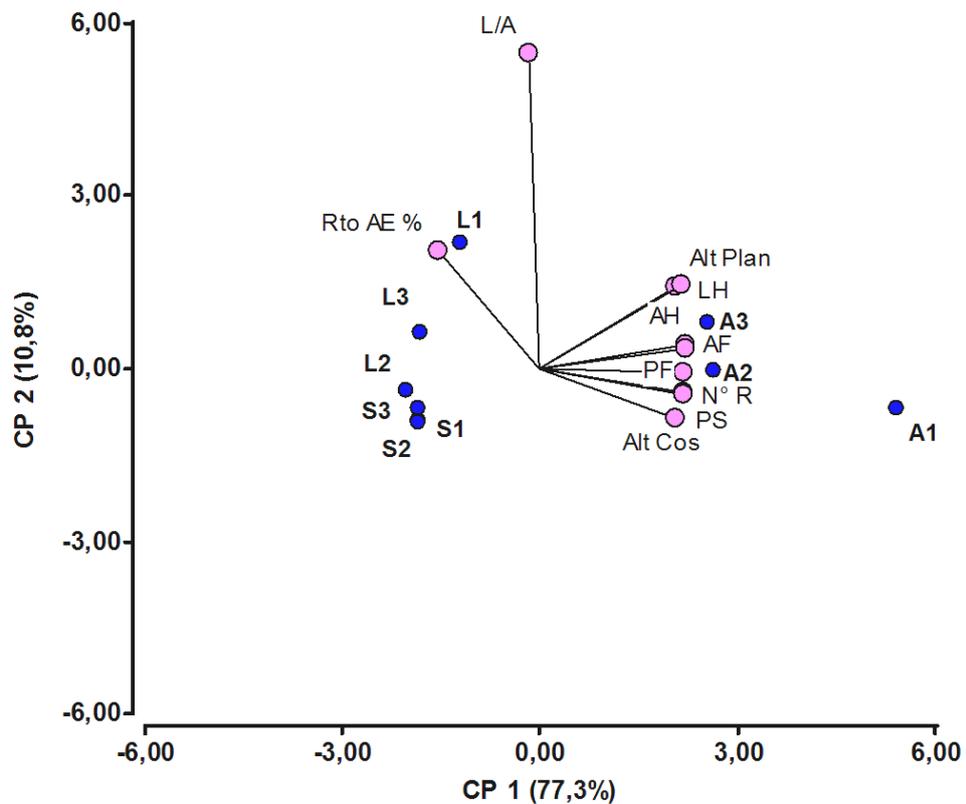


Figura 2.13: Análisis de componentes principales de los caracteres evaluados en la población base.

Los valores medios observados en las poblaciones derivadas del cultivar Champaquí-FCA se presentan en la Tabla 2.6. De acuerdo a estos parámetros y el índice de selección propuesto, se seleccionaron 25 individuos tomados como plantas madres para los ensayos posteriores.

Tabla 2.6: Medidas de resumen para cada una de las variables evaluadas en tres poblaciones derivadas del cultivar de peperina, Champaquí-FCA.

Variable	Media	D.E.	CV	Mín.	Máx.
Alt Plan	15,56	3,71	23,84	9,00	23,90
N° R	38,64	27,37	70,85	13,00	122,00
Alt Cos	101,81	22,69	22,29	65,00	150,00
PF	371,83	226,71	60,97	103,00	902,00
PS	153,69	94,36	61,39	15,00	370,00
AF	5,51	1,22	22,13	4,64	6,90
Rto AE %	0,60	0,15	24,35	0,36	0,85

Alt Plan: Altura de plantín; N° R: número de ramas primarias; Alt Cos: Altura de la rama más larga a cosecha; PF: Peso fresco a cosecha; PS: peso seco; AF: área foliar y Rto.AE: % de rendimiento de aceites esenciales.

CONCLUSIONES

Se generó una población de base genética amplia que sirve de población inicial para el plan de mejoramiento propuesto en este trabajo.

Se herborizó e identificó material de cada lugar de recolección, contándose con ejemplares patrones para futuras determinaciones.

Se inició la conservación de germoplasma a largo y mediano plazo como una estrategia de preservación de la especie y fuente de genes para posteriores estudios.

De manera general, los caracteres morfológicos y químicos evaluados, mostraron que aún se mantienen rangos grandes de variación en la especie, dentro de las poblaciones silvestres, a pesar del impacto de la recolección.

Las características ambientales de cada sitio de recolección y la variación intra- e interpoblacional determinada, permiten inferir una posible diferenciación en ecotipos, como respuesta adaptativa de la especie.

La población de base genética amplia generada mostró variabilidad para los caracteres evaluados y permitió definir los límites en cuanto a los caracteres definidos como criterio de selección.

Finalmente puede destacarse la importancia de los resultados para la toma de decisiones relacionadas con la conservación de la especie y las posibilidades de continuar con distintos planes de mejoramiento según diferentes intereses.

Se destaca además, las ventajas del cultivo de plantas medicinales respecto a la recolección silvestre, teniendo en cuenta la demanda y la presión de extracción que tiene la especie, fundamentalmente en la provincia de Córdoba, ya que un cultivo orientado, conociendo el material de partida, dará mejor respuesta a los requerimientos industriales de calidad y estabilidad en cuanto a su rendimiento y composición química.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, R. P. 2007. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th Edition. Allured Publishing Co.
- Amujoyegbe, B. J.; Agbedahunsi, J. M. y 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.
- Banchio, E.; Zygadlo, J. y Valladares, G.R. 2002. Cambios cuantitativos en el aceite esencial de *Myntosthachis mollis* (peperina) producidos por el daño de trips. I Congreso Latinoamericano de Fitoquímica.
- Benítez, I. 2001. Conservación de recursos fitogenéticos *ex situ*. En: Estrategias en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur. PROCISUR. Montevideo. pp. 79-90.
- Bustos, J. A. y Bonino, E. E. 2005. Cosecha silvestre de peperina (*Minthostachys mollis*) en Córdoba, Argentina: implicancias socioeconómicas. *Revista Iberoamericana de Economía Ecológica*, 2: 45-55.
- Cubero, J. I. 1999. Introducción a la Mejora Genética Vegetal. Ed. Mundi-Prensa. España, 365 pp.
- Cubero, J. I. 2003. Introducción a la Mejora Genética Vegetal. 2º edición. Ed. Mundi-Prensa. España, 567 pp.
- Dimitri, M. J. 1972. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Acme SACI, Bs As. Argentina. Tomo 1, 819 pp.
- Epling, C. 1939. Las Labiadas en el Noroeste de la Argentina. *Instituto M. Lillo*, 4: 434-435.
- FAO, 1996. Pest resistance to pesticide in agriculture. Importance, recognition and countermeasures. Rome. FAO, 32 pp.
- Gupta, M. P. 1995. 270 Plantas medicinales Iberoamericanas. Convenio Andrés Bello. CYTED. Bogotá, Colombia. pp. 318-319.
- InfoStat 2013. InfoStat versión 2013. Grupo *InfoStat*. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

- Jaramillo, S. y M. Baena. 2000. Material de apoyo a la capacitación en conservación *ex situ* de recursos filogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos, Cali, Colombia, 210 pp.
- Kursar, T.; Caballero, C.; Capson, T.; Cubilla Rios, L.; Gerwick, W.; Heller, M.; Ibañez, A.; Liningthon, R.; Mc Phail, K.; Ortega Barria, E.; Romero, L. y Coley, P. 2007. Linkini bioprospecting with sustainable development and conservation: The Panama case. *Biodiversity Conservation* 16: 2789-2800.
- Muñoz, F., 2000. Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado. Ed. Mundi-Prensa. España. 336 pp.
- Ocaño, S. 2015. Generación de poblaciones de peperina (*Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling) mejoradas por rendimiento, sanidad y calidad de aceites esenciales. En: Plantas Aromáticas y Medicinales: Modelos para su Domesticación, Producción y Usos Sustentables. Ojeda, M.S. y Karlin, U. O. (Eds). Editorial Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, 183 pp.
- Ojeda, M. 2004. Caracterización de poblaciones y avances en la domesticación de peperina *Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb. Tesis Doctoral, 134 pp.
- Ojeda, M.; Ocaño, S. y Massuh, Y. 2015. Domesticación de Especies Aromáticas y Medicinales Nativas. En: Plantas Aromáticas y Medicinales: Modelos para su Domesticación, Producción y Usos Sustentables. Ojeda, M.S. y Karlin, U. O. (Eds). Editorial Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, 183 pp.
- Pomar S., 1993 Contenido y variación del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling en distintos órganos y épocas del año. Seminario, Ciencias Biológicas FCFN, UNC, Córdoba.
- Rasband, R. 2002. ImageJ: Image Processing and analysis in Java. National Institutes of Health, Estados Unidos. Disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij>. Activo Julio 2017.
- Retamar, J. 1988. Phytochemical modifications in aromatic species. International conference on Essential oils, flavours, fragrances and cosmetics. Peking, China. 202 – 216.
- Retamar, J.A. y Mazzola, E. B. 1963. Estudios sobre hidrogenación de la esencia de peperina. *Revista de la Facultad de Ingeniería Química Universidad Nacional de Litoral*, 33: 49-55.

- Retamar, J.A.; Malizia, R.A.; Molli, J. S. y Cardell, D. A. 1996. Química fina aplicada al aceite esencial de peperina. *Essenze-Derivati Agrumari*, 66: 279-287.
- Roberts, E. H. y Ellis, R. H., 1977. Prediction of seed longevity at sub-zero temperatures and genetic resources conservation. *Nature*, London, Inglaterra, 268: 269-296.
- Soraru, S. B. y Bandoni, A. L. 1978. Plantas de la medicina popular Argentina. Editorial Albatros, Buenos Aires, Argentina, 163 pp.
- Zygadlo, J.; Banchio, E. y Valladares G. 2005. Effects of mechanical wounding on essential oil composition and emission of volatiles from *Minthostachys mollis*. *Journal Chemistry Ecology*, 31(4): 719-727.
- Zygadlo, J. A.; Maestri, D. M.; Lamarque, A. L.; Guzmán, C. A.; Velasco-Negueruela, A.; Pérez-Alonso, M. J.; García-Vallejos, M. C. and. Grosso, N. R. 1996. Essential oil variability of *Minthostachys verticillata*. *Biochemistry Systematic Ecology*, 24 (4): 319-323.

CAPÍTULO 3

VARIABILIDAD Y PARÁMETROS GENÉTICOS EN FAMILIAS DE PEPERINA EN PROCESO DE SELECCIÓN

INTRODUCCIÓN

La variabilidad natural es una característica fundamental de las especies, que les permite sobrevivir y reproducirse mejor en un mayor rango ambiental (Abbot *et al.*, 2010). La investigación de la variabilidad existente dentro de una especie y los estudios sobre la naturaleza de esas variaciones son relevantes a la hora de dar pautas de manejo para dicha especie (López *et al.*, 2003). Por otra parte, la existencia de variabilidad, que previamente debe ser cuantificada, es un requisito indispensable para todo programa de mejoramiento. Esta variabilidad puede ser natural o inducida, pero la natural será más eficiente y económica.

La selección artificial, se puede definir como el proceso de seleccionar, a partir de una población base genéticamente variable, los mejores individuos o progenie, para recombinarlos posteriormente entre sí y formar así la población mejorada (Wricke y Weber, 1986). El nuevo germoplasma obtenido de esta manera se utiliza como población base para un nuevo ciclo de selección, y así se sigue utilizando sucesivamente por cuantos ciclos se desee. El límite para la selección, será evidentemente el agotamiento de la variabilidad genética.

En el caso de la selección fenotípica, los individuos se seleccionan en general, sobre la base de características agronómicas que se pueden identificar visualmente. Cabe señalar, que la mayoría de los caracteres con importancia económica son de naturaleza cuantitativa, y están controlados por un gran número de genes e influenciados por el ambiente de manera marcada, de tal forma que los fenotipos siguen una distribución normal. Las semillas cosechadas de estos individuos seleccionados, constituyen la población mejorada, siempre que se asegure la reproducción y el cruzamiento al azar entre ellos. De esta manera se realizan selecciones sucesivas de genotipos con base en características deseadas. La expresión de dichas características se

observa indirectamente a través del fenotipo pero debe ser una manifestación del genotipo y no un efecto del ambiente (Jaramillo y Baena, 2000).

El proceso de mejoramiento de las plantas depende de la existencia de variabilidad genética a partir de la cual se pueda realizar selección. El mejoramiento genético procura un aumento en la frecuencia de determinados caracteres favorables, por lo que tiende a conservar la variabilidad para los caracteres que son objetivos de mejora (Vilela Morales *et al.*, 1997). Por ello, es importante poseer información sobre la variabilidad genética original de un material en proceso de selección.

En el caso de la evaluación de progenies, el proceso involucra la obtención de progenie (hermanos completos y medios hermanos), la evaluación experimental de esa progenie y la selección de los superiores. Según Chaves (1997) esta forma de selección, se puede considerar como una filosofía o una estrategia de mejoramiento, más que un método particular. La estrategia es mantener poblaciones variables, con el máximo de oportunidad de recombinación alélica; dicha estrategia está relacionada con la disminución de la vulnerabilidad genética de los cultivos.

En el mejoramiento genético, además de conocer los aspectos agronómicos de la especie, es necesario conocer las características genéticas de la población en estudio. La genética de un carácter métrico se basa en el estudio de su variación y su partición en componentes atribuibles a diferentes causas. De este modo se describen los atributos que permiten diferenciar poblaciones de una misma especie y determinar su estructura, variabilidad y utilidad (Jaramillo y Baena, 2000).

Para poder evaluar si el proceso de selección está siendo eficiente es necesario tomar como herramienta parámetros genéticos que van a ser estimados a través de la variación fenotípica de los caracteres medidos.

La cantidad de variación se mide y se expresa como la varianza. La varianza total o fenotípica es una medida de la variabilidad fenotípica entre los individuos de la población, y sus componentes son la varianza genotípica, la varianza ambiental y la varianza de la interacción genotipo ambiente. En consecuencia, la varianza fenotípica depende de la suma de las varianzas genética, ambiental y de interacción.

La varianza genotípica se origina por las diferencias que existen entre los genotipos, por lo que cuando mayor sea el número de loci segregantes, mayor será el número de genotipos diferentes en la población (Molina, 1992). La varianza ambiental comprende toda la variación de origen no genético, y gran parte de ésta se encuentra fuera del control del investigador; la varianza de la interacción genotipo-ambiente mide el comportamiento diferencial de los genotipos según el ambiente en el que se desarrollan (Chaves, 2001).

El amplio rango de ambientes climáticos y edáficos en los que se cultiva puede provocar respuestas diferenciales del comportamiento de los genotipos como resultado de la interacción genotipo por ambiente (G x A) (Abbot, 2011). La interacción indica que el comportamiento de los genotipos no es consistente a través de distintos ambientes (Ferreira *et al.*, 2006). Campbell y Jones (2005) definen la interacción G x A como la respuesta diferencial de los genotipos para una determinada característica en diferentes ambientes. Borém y Miranda (2009) señalan que las poblaciones cultivadas en ambientes diferentes pueden tener comportamientos diferentes.

El concepto de ambiente ha sido discutido ampliamente por gran número de investigadores. Allard (1960) lo expresa como la suma de todas las condiciones externas que afectan el crecimiento y desarrollo de un organismo. Según Lin *et al.* (1986), el efecto ambiental sobre un genotipo depende del suelo y de las condiciones atmosféricas. Para estos investigadores el suelo permanece casi constante de año en año y puede ser, a pesar de todo, considerado como un efecto fijo. El tiempo atmosférico es más complejo, porque tiene una parte predecible representada por la zona climática general y una parte no predecible representada por la variación del clima, año en año.

En el mejoramiento de plantas, el estudio de la interacción G x A es esencial para la eficiencia del proceso selectivo, debido a que la mayoría de los caracteres de importancia agronómica son de herencia cuantitativa. Estos caracteres presentan distribución continua, poseen herencia poligénica y son muy influenciados por las variaciones del ambiente (Chaves, 2001). Cuando la interacción genotipo x ambiente es significativa a través de distintos ambientes, se ve reducida la utilidad de los promedios de los genotipos sobre todos los ambientes para la identificación de genotipos superiores.

En general, se ha aceptado que a mayor variabilidad genética de una especie, mayor su estabilidad sobre el ambiente. Allard y Bradshaw (1964) indican que una población puede estar compuesta por un número de individuos diferentes, cada uno adaptado a un rango diferente de ambientes (homeostasis poblacional), o puede estar conformado por individuos semejantes, pero cada uno adaptado a un rango de ambientes (homeostasis individual). Por otra parte, cuando un cultivar es una mezcla de genotipos, los diferentes genotipos pueden adaptarse a diferentes condiciones ambientales con el resultado de que el cultivar tenga mayor adaptación. Este mecanismo de estabilidad se debe a la homeostasis poblacional y se atribuye a la heterogeneidad del cultivar.

Cuando la varianza ambiental es alta en relación a la variabilidad total, tiende a reducir la variabilidad genética, lo que implica mayor dificultad en la obtención de ganancia genética, es decir, cuanto mayor sea su proporción en relación a la variabilidad total, más difícil es una selección eficaz (Hartwig *et al.*, 2007).

Los componentes de la varianza fenotípica se pueden estimar con las esperanzas de los cuadrados medios generadas por los análisis de varianza, conforme la metodología propuesta por Vencovsky y Barriga (1992).

Una forma de evaluar la continuidad de caracteres fenotípicos de los padres en la descendencia es a través de la *heredabilidad*.

La heredabilidad en sentido amplio (H^2) es un parámetro genético que se define como el porcentaje de la variación observada que es atribuible a los genes. Es una forma de medir si las diferencias que se observan entre individuos se deben al genotipo o al ambiente y en qué proporción a uno y a otro; puede tomar valores entre 0 y 1 (Cubero, 1999).

$$H^2 = VG/VF;$$

$$VF = VG + VA + VG \times VA$$

Siendo: H^2 = Heredabilidad en sentido amplio; VG= Varianza genotípica; VA= varianza ambiental; VG x VA= varianza de la interacción genotipo-ambiente.

Para los caracteres métricos, la Heredabilidad es una de sus propiedades más importantes, y expresa la proporción de la varianza total que es atribuible a los efectos medios de los genes, o sea, expresa la confiabilidad del valor fenotípico como indicador del valor genotípico. En sentido amplio, la heredabilidad (H^2) es el cociente de la varianza genotípica y la fenotípica y puede variar en distintos caracteres del mismo organismo, para el mismo carácter en organismos distintos e incluso para el mismo carácter en poblaciones distintas del mismo organismo. La precisión de la Heredabilidad depende de una adecuada estimación de los componentes de varianza asociados. La utilidad de su estimación radica en el sentido predictivo de la respuesta a la selección (Nyquist, 1991).

El análisis de los parámetros genéticos es de gran importancia, pues la información proveniente de los componentes de la varianza genética y la heredabilidad son esenciales para hacer inferencias acerca de los beneficios que pueden obtenerse con la selección (Sobierajski *et al.*, 2006)

En peperina, los caracteres más interesantes de seleccionar son aquellos relacionados con la producción de materia vegetal y de aceites esenciales como así también los compuestos que forman ese aceite esencial, ya que es la característica que provocará su aceptación o rechazo por parte del consumidor. Así, la selección se orienta por un lado a caracteres como peso fresco, peso seco, altura de planta, número de ramas u área foliar, ya que mayores valores implican mayor rendimiento tanto en material vegetal como en aceites esenciales; y por otro lado, hacia la presencia mayoritaria de alguno de sus compuestos principales para una mejor aceptación del usuario consumidor. Como siguiente requisito es necesario que esos caracteres seleccionados se mantengan en la descendencia, para poder generar una población con mayores rendimientos.

En este contexto y considerando que ante una misma presión ambiental la expresión fenotípica está determinada por el genotipo y su interacción con el ambiente, al comparar en un mismo ambiente individuos de distintas familias se expresarán características morfológicas y de aceites esenciales diferenciales que pueden ser heredadas por la descendencia.

Para poner a prueba esta hipótesis se planteó como objetivo específico caracterizar fenotípicamente las familias evaluadas y determinar sus parámetros genéticos. El propósito de esta etapa del proyecto fue, evaluar la diversidad en caracteres cuantitativos morfológicos y reproductivos de 19 familias de peperina en proceso de selección y determinar a nivel fenotípico, genotípico y ambiental, los componentes de la varianza y la heredabilidad en sentido amplio. Mediante la estimación de estos parámetros genéticos se espera contribuir a diseñar estrategias de mejoramiento genético en peperina y dar continuidad al programa propuesto.

Objetivos Específicos

- Evaluar las modificaciones en caracteres de rendimiento en materia vegetal y aceites esenciales, producidas por la recombinación entre el germoplasma de las poblaciones silvestres y el cultivar Champaquí-FCA.
- Determinar a nivel fenotípico, genotípico y ambiental, los componentes de la varianza y la heredabilidad en sentido amplio en familias de peperina en proceso de selección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación de parámetros genéticos

Una forma de estimar la heredabilidad en sentido amplio de una serie de caracteres es a través del estudio de las variaciones entre propágulos o replicas de un clon, lo que permite estimar la porción de varianza ambiental y de la varianza genética dentro de la varianza fenotípica total. El análisis de progenies clonales de plantas selectas es uno de los estudios genéticos frecuentemente usados en plantas aromáticas nativas. Para implementar esta metodología se seleccionan las plantas madres proveedoras de propágulos; a partir de éstos, las plantas que se obtienen se implantan en un mismo ambiente para ajustar su cultivo y evaluar el rendimiento y composición química de los principios activos que proporcionan a la cosecha (Muñoz, 2000).

Conforme a esta metodología y de acuerdo a los objetivos específicos planteados, se evaluaron los caracteres considerados en este estudio, tanto a nivel de plantines mantenidos en invernadero como en plantas adultas cultivadas bajo condiciones de campo. Las semillas recolectadas sobre las plantas seleccionadas en la etapa anterior se sembraron en invernadero manteniendo su identificación como familias de medios hermanos. Además, se prepararon plantines clonales de las plantas seleccionadas (tomadas como plantas madres de cada familia). A los plantines se les realizó un seguimiento en invernadero evaluando: prendimiento en el caso de plantines clonales; porcentaje de emergencia de plántulas, en el caso de multiplicación por semillas, dinámica de crecimiento de las plántulas y mortandad de plántulas.

En la primavera siguiente se llevaron los plantines a campo y se analizaron las planta madres y sus descendencias, para poder evaluar la variación de los caracteres estudiados, dentro y entre familias.

El diseño fue en bloques al azar con tres repeticiones de parcelas constituidas por las familias. En cada repetición de familia se incluyó una fila de clones de la planta madre que fue evaluada conjuntamente con sus hijas y que permitió realizar estimaciones de parámetros genéticos.

Los caracteres evaluados fueron los relacionados a resistencia al virus CMV, rendimiento en material vegetal, rendimiento y composición en aceites esenciales. Se tomaron: Altura de planta (cm.), Área foliar (cm².), Peso fresco (gr.), Peso seco (gr.), Número de ramas, Rendimiento de aceite esencial (gr./100 gr.), Presencia de síntomas de virus.

Con los resultados del ensayo se pudo estimar el error experimental a través de las repeticiones, la partición de la varianza fenotípica en una componente de varianza entre clones y dentro de clones, permitió estimar varianzas genéticas y ambientales asociadas a cada carácter cuantitativo. Usando estas componentes se determinaron los valores de heredabilidad en sentido amplio. Luego, a partir de estos análisis se realizó la selección de individuos que reunían las características de sanidad, rendimiento y calidad según se está buscando.

Obtención de plantines por propagación agámica

El material utilizado se constituyó de clones obtenidos a partir de plantas seleccionadas sobre el ensayo de evaluación de la población base, llevado a cabo en el Campo Escuela de la Facultad de Ciencias Agropecuarias-UNC. Las plantas de este ensayo, fueron manejadas a campo durante un ciclo de cultivo para su evaluación con fines de selección. Entre las mismas, se seleccionaron de acuerdo al Índice descrito en el capítulo anterior, aquellos individuos que cumplían con dicho parámetro en cada uno de los caracteres evaluados. Del total de plantas seleccionadas (n=25) sólo se pudieron obtener el número deseado de individuos en 19 de ellas.

La multiplicación clonal se realizó en cajones de madera, durante el otoño, dentro del invernadero de la FCA-UNC. En cada cajón se pusieron 20 estacas obtenidas de cada planta madre. Para la inducción del enraizamiento, las estacas se colocaron en solución de ácido indol butílico (IBA) 300 ppm preparado en 100 ml de una mezcla de alcohol y agua (30/70). Un tercio de la longitud de la estaca se sumergió durante 5 minutos en la solución de hormona y luego se dejaron secar durante 15 minutos. Posteriormente se colocaron en los cajones donde el sustrato utilizado estuvo constituido por tierra negra y vermiculita en una relación 3:1. Luego se mantuvieron los cajones en invernadero a temperatura ambiente y con riego por neblina automatizado. Posteriormente a los 60 días se determinó el porcentaje de estacas que presentaron brotes con respecto al total de estacas plantadas.

Evaluación de plantines en invernadero

De las mismas plantas seleccionadas en la población base de las que se obtuvieron los plantines clonales descritos anteriormente, se recolectaron semillas maduras para su germinación. Se conoce que el sistema reproductivo predominante es la alogamia, por lo que se considerará que las semillas cosechadas de una planta determinada, son de madre común y de padre incierto, dando progenies constituidas de hermanos completos o de medios hermanos en proporciones no conocidas.

El objetivo de esta etapa fue establecer la respuesta de las diferentes familias estudiadas en la producción de plantines; así, se pretendía obtener los individuos para luego ejecutar la evaluación de los mismos a campo.

El ensayo se realizó en un invernadero ubicado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba.

El sustrato utilizado estuvo constituido por tierra negra y vermiculita en una relación 3:1. Se sembraron 200 semillas por familia en cajones a modo de almácigo. Las labores culturales realizadas posteriormente a la siembra fueron riego por neblina y desmalezado manual. A los plantines se les realizó un seguimiento en el invernadero evaluando: porcentaje de emergencia de plántulas, dinámica de crecimiento de las plántulas y mortandad de plántulas.

Plántulas: Cuando las plántulas alcanzaron aproximadamente 5 cm de altura se trasplantaron a macetas de 8,5 cm. de diámetro las que se mantuvieron bajo cubierta.

Plantín: En plántulas de 30 días se realizó una medición de altura determinando el crecimiento por planta en cada una de las familias. Conjuntamente se recolectó una muestra de hojas del tercio medio del eje del plantín en 30 individuos tomados al azar dentro de cada familia, para poder determinar el área foliar, y el largo y ancho de las hojas.

Las labores culturales realizadas hasta el momento del transplante fueron riego y desmalezado.

En síntesis, las evaluaciones para conocer la variabilidad y el comportamiento de las familias comenzaron desde la producción de plantines a través de los siguientes caracteres:

- Porcentaje de germinación
- Porcentaje de mortandad: plántulas que después de germinadas morían.
- Porcentaje de mortandad en maceta: plántulas que después de trasplantadas a maceta morían.
- Crecimiento en los primeros 30 días (altura en cm.)

- Se tomaron muestras de hojas, seleccionadas al azar del tercio central de la rama más larga (hojas totalmente desarrolladas) y se registró:
 - Largo de hoja: Medido desde la base de la lámina hasta su ápice.
 - Ancho de hoja: Medido perpendicularmente a lo largo de la misma y considerando su magnitud máxima.
 - Índice de forma de hoja: Relación que da una idea sobre la forma de la hoja y obtenida por el cociente entre el largo y el ancho de la hoja (largo/ancho).
 - Área foliar (cm²).

Análisis estadístico: Los resultados obtenidos para cada una de las variables medidas fueron sometidos al análisis de la varianza y las diferencias entre medias se determinaron mediante el test DGC de comparación de medias, utilizando el software Infostat (Infostat, 2013).

Evaluación y Caracterización de las familias a campo

En la primavera siguiente se llevaron los plantines a campo (Fig. 3.1). Para poder evaluar la variación de los caracteres estudiados, dentro y entre familias de una misma población seleccionada, se analizó la descendencia de las plantas madres y las planta madres en forma conjunta.



Figura 3.1: Imágenes de los plantines clonales y de semillas, obtenidos de 19 individuos seleccionados en la población base.

El ensayo se realizó en las instalaciones del Campo-Escuela de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba, ubicado en Capilla de

los Remedios, Provincia de Córdoba (31° 29' 11'' S- 64° 00' 22'' O; Km 15 del camino a Capilla de los Remedios).

Los caracteres evaluados están relacionados con resistencia a virus *Cucumber mosaic virus* (CMV), rendimiento de materia vegetal, rendimiento y calidad de aceites esenciales. Se registró: Síntomas de CMV, altura de planta (cm.), número de ramas, área foliar (cm²) antes de floración y peso fresco (gr.). Posterior a la cosecha se registró: peso seco (gr.), rendimiento de aceite esencial (ml/100 gr. MS) y composición de los aceites por Cromatografía (GC-MS).

En este sentido, durante el transcurso del ensayo, se evaluaron las plantas a campo (Fig. 3.2) teniendo en cuenta estos caracteres de interés, propuestos en este proyecto.



Figura 3. 2: Ensayo a campo: 1) Transplante de los plantines a campo; 2) Crecimiento de los plantines en los primeros días de cultivo; 3) Ensayo al primer mes de implantado a campo; 4) Ensayo al tercer mes de implantado a campo; 5) Cultivo al cuarto mes de implantado y 6) Cultivo durante el inicio de la floración.

En otoño se juntaron semillas en cada familia de medios hermanos manteniendo la identificación de la planta madre y luego se procedió a cosechar el ensayo (Fig. 3.3). El material cosechado se lo conservó en bolsas de papel madera en una habitación

acondicionada para que el mismo se seque en buenas condiciones para luego poder realizar los análisis propuestos (destilación y cromatografías).

Aceites esenciales: Para establecer el rendimiento en cantidad de los aceites esenciales, se recolectaron muestras de plantas que se secaron luego bajo cubierta y con circulación de aire. Las muestras se constituyeron con flores, hojas y tallos secos. La obtención del aceite esencial se realiza mediante destilación por el método de arrastre con vapor de agua en equipo Clevenger modificado, con cámara de extracción separada. Se calcula el rendimiento como: volumen de aceite esencial / 100 gr de materia seca (MS). El proceso de destilado se realizó en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.



Figura 3.3: Cultivo en los momentos: 1) Antes, 2) Durante y 3) Después de la cosecha.

Análisis estadístico: Los resultados obtenidos para cada una de las variables medidas fueron sometidos a los análisis estadísticos correspondientes utilizando los software Infostat (Infostat, 2013).

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Obtención de plantines clonales

El número de plantines obtenidos por multiplicación vegetativa, que lograron desarrollarse favorablemente, fue expresado como un porcentaje con respecto al total de estacas colocadas a enraizar, denominado “porcentaje de prendimiento”. En la Fig. 3.4 se muestran los porcentajes de prendimiento, tomados a los 60 días de implantadas las estacas.

Se observó variación entre las PM selectas y se diferenció aquéllas menos adaptadas a este tipo de multiplicación, cuyos plantines se perdieron arriba del 50 %, (PM 5, 12, 13, 15, 16 y 17); mientras que otras mantuvieron una alta proporción en cuanto al número inicial de estacas, destacándose las PM 6, 9, 14, 18 y 19. Las PM 6 y 9 mostraron un 100% de prendimiento de estacas a los 60 días de implantadas.

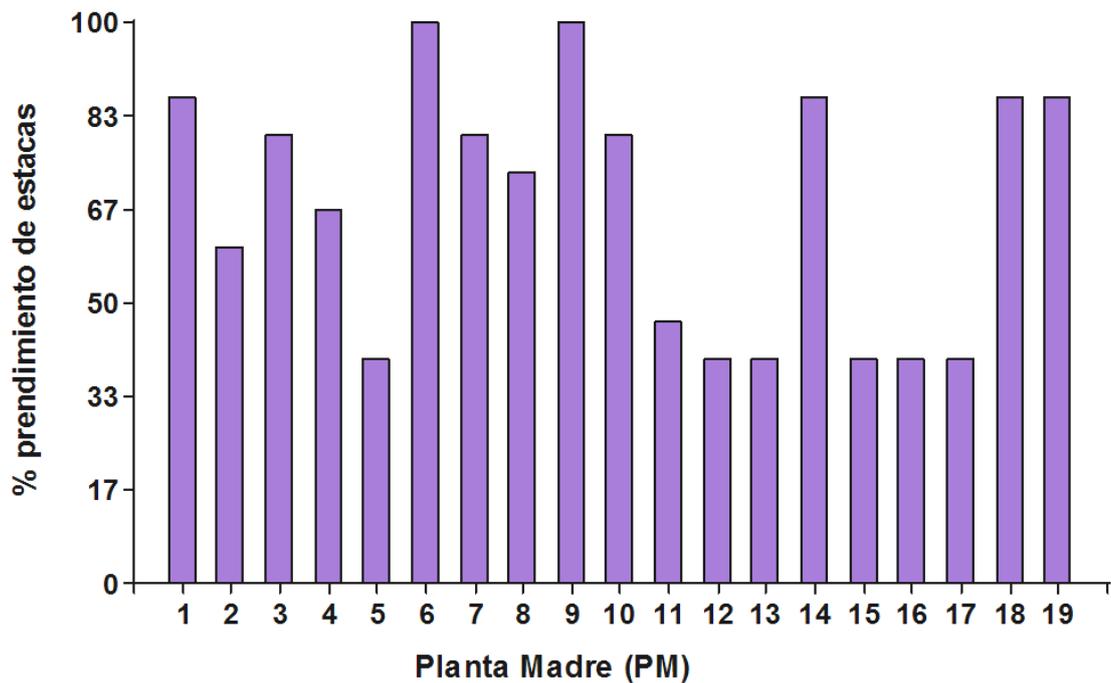


Figura 3.4: Porcentaje de prendimiento de estacas clonales derivadas de 19 plantas madres (PM) selectas.

Evaluación de plantines en Invernadero

Germinación

En todas las familias se observó un marcado aumento en el porcentaje de germinación después de transcurridos los primeros 10 días desde la siembra (Fig.3.5), alcanzando los máximos valores a los 21 días de la siembra.

A los 21 días desde la siembra, los porcentajes de germinación alcanzados oscilan entre el 51% y el 100% entre las distintas familias (Fig. 3.5). En todos los casos

el porcentaje de germinación es elevado, por lo que se considera que no es necesario realizar tratamientos para la germinación ya que sin ellos se lograron altos porcentajes. Cabe aclarar que las semillas utilizadas fueron cosecha del mismo año.

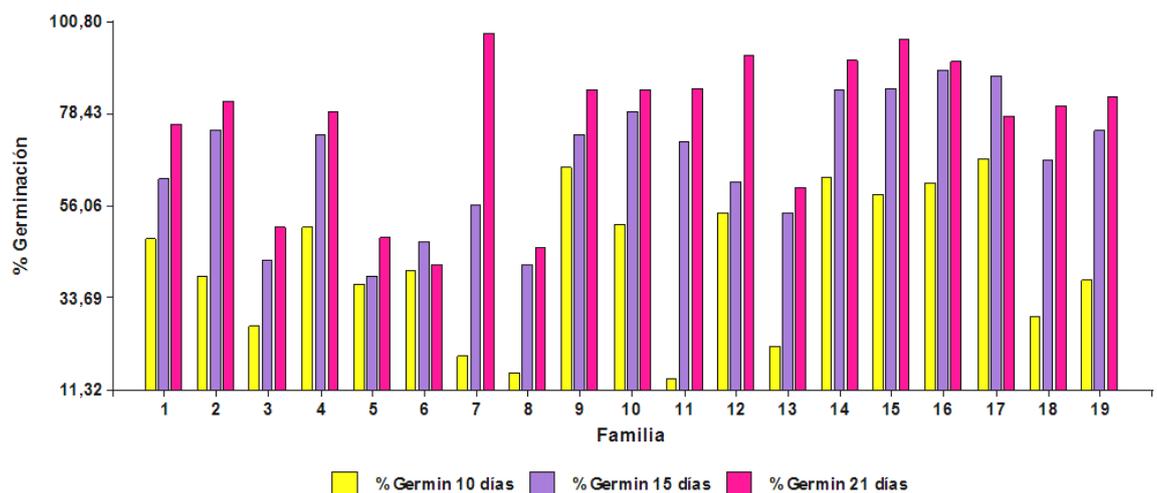


Figura 3.5: Comparación de porcentajes de germinación entre 19 familias estudiadas, a los 10, 15 y 21 días de sembradas.

Mortandad de plántulas

Para mortandad de plántulas, se registraron las plántulas que después de germinadas morían. Los valores obtenidos, fueron prácticamente nulos, sólo en la familia número 6 se registraron plántulas muertas después de su emergencia en muy bajo porcentaje (1,5 %). En las familias restantes no hubo mortandad de plántulas. Todas las plántulas obtenidas sobrevivieron hasta el trasplante a maceta.

Supervivencia en maceta

Para supervivencia de plántulas en maceta, se registró las plántulas que después de trasplantadas a maceta morían. En este caso, se observó mortandad de plántulas en varias familias (Tabla 3.1). Pero dadas las características climáticas en esa temporada de mucha sequía y alta irradiación solar, se toma a este motivo como causal de esa mortandad observada en plantas recién trasplantadas a maceta.

Altura de Plantín

Referido al crecimiento en los primeros 30 días de desarrollo de la planta (altura en cm). Datos provenientes de plantas en condiciones de invernadero.

En cuanto a este carácter las plantas de la familia N° 15 se diferenciaron significativamente del resto ($P \leq 0,05$), presentando una media de 24,9 cm de crecimiento en altura; mientras que la familia N° 11 es la de menor crecimiento con 6,9 cm de altura como se observa en el gráfico a continuación (Fig. 3.6 y Tabla 3.1).

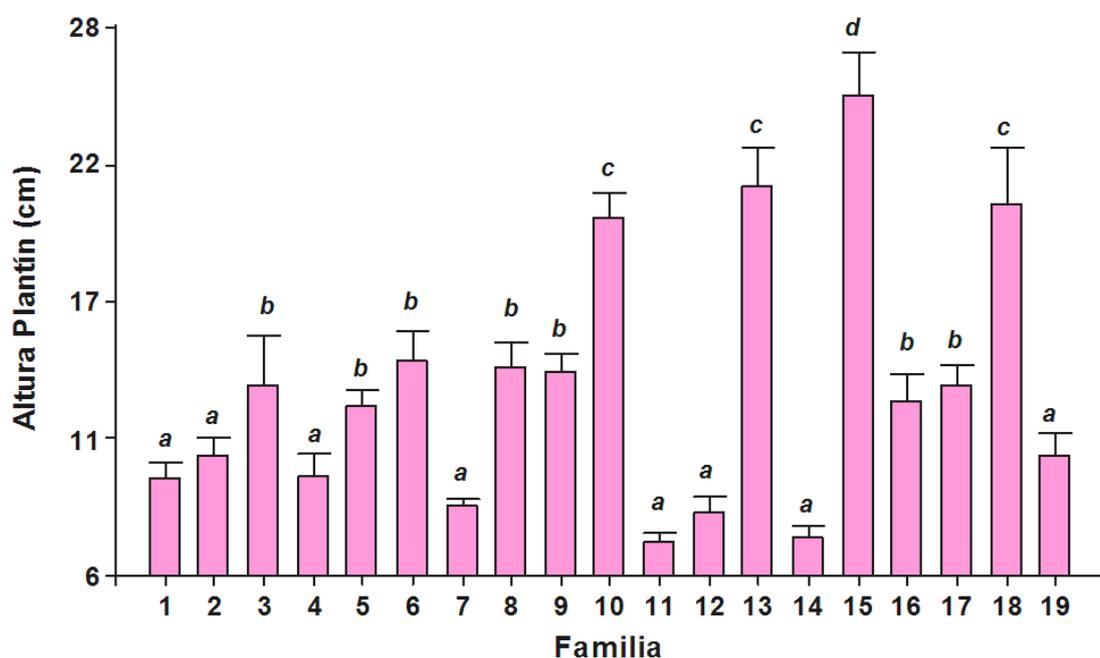


Figura 3.6: Comparación de la altura media de plantín de 30 días entre los plantines de las distintas familias. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha= 0,05$).

Parámetros foliares

Los caracteres morfológicos foliares evaluados fueron largo, ancho, relación largo-ancho y superficie de la hoja. El análisis estadístico de cada uno de estos caracteres determinó la existencia de diferencias significativas entre las familias, excepto para el carácter Índice foliar (índice dado por la relación largo/ancho de hoja); en este caso, el análisis no mostró diferencias significativas entre las familias.

En áreas foliares el análisis estadístico si mostró diferencias significativas, siendo la de mayor área la familia N° 6. (Fig.3.7)

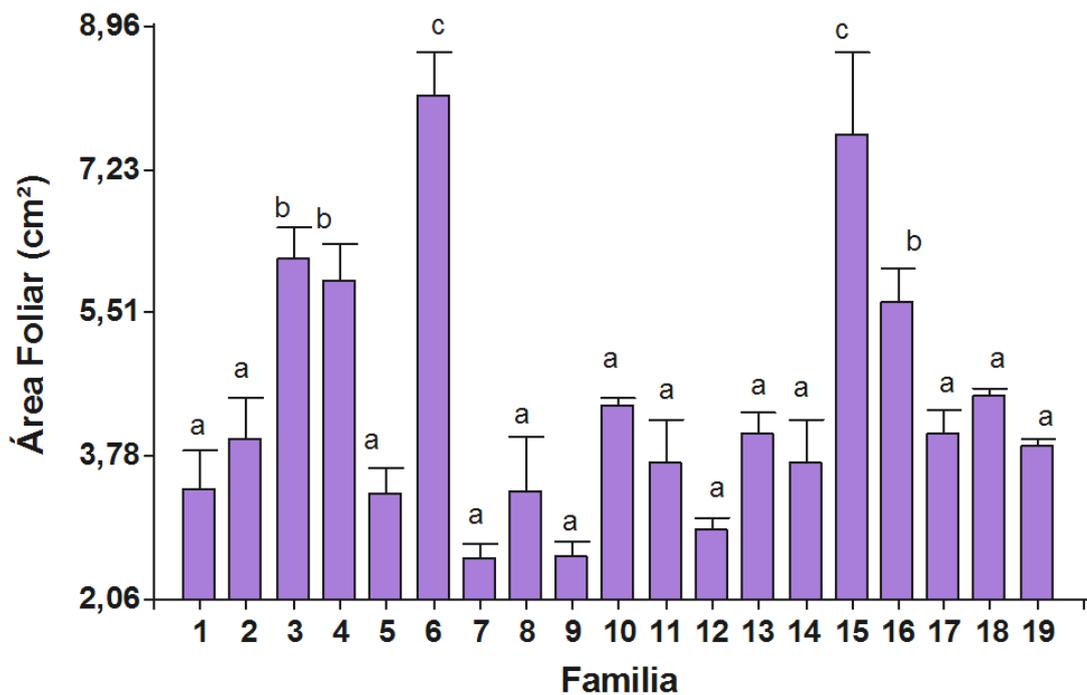


Figura 3.7: Comparación del área foliar entre muestras de hojas de 19 familias de peperina. Letras diferentes dentro de cada caso indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

Al analizar en conjunto las características observadas, el análisis de la varianza muestra que existen diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre las 19 familias estudiadas, fundamentalmente en Altura de plantín y área foliar, destacadas en la Tabla 3.1.

En un análisis multivariado de Componentes principales, el resultado obtenido muestra que el 75,9 % de la variabilidad observada entre las Familias fue explicada por las dos primeras componentes (CP1 y CP2) (Fig. 3.8). A nivel de la CP1, componente que explica el 45,3 % de la variabilidad total, las variables con mayor inercia fueron % de germinación a los 15 días y altura de plantín a los 30 días; mientras que a nivel de la CP2 (componente que explica el 30,6 % de la variabilidad observada), las variables que

permitieron establecer diferencias entre las Familias fueron: % de germinación a los 21 días y área foliar (AF).

Tabla 3.1: Valores medios para cada una de las variables medidas en plantines de la descendencia de plantas madres selectas.

Familia	% 10 días ¹	% 15 días ¹	% 21 días ¹	% superv. ²	% estacas ³	Altura (cm)	Área foliar
1	48	62,5	76,0	72,4	86,7	9,4 c	3,37 a
2	39	74,5	81,5	88,9	60,0	10,3 d	4,01 a
3	27	43,0	51,0	100,0	80,0	13,2 e	6,16 b
4	51	73,5	79,0	76,0	66,7	9,6 c	5,9 b
5	37	39,0	48,5	98,3	40,0	12,3 e	3,34 a
6	40,5	47,5	42,0	79,1	100,0	14,2 e	8,13 c
7	19,5	56,5	98,0	76,6	80,0	8,3 b	2,55 a
8	15,5	42,0	46,0	73,3	73,3	13,9 e	3,35 a
9	65,5	73,5	84,0	81,2	100,0	13,8 e	2,59 a
10	51,5	79,0	84,0	80,0	80,0	19,9 f	4,4 a
11	14	71,5	84,5	76,8	46,7	6,9 a	3,7 a
12	54,5	62,0	92,5	83,3	40,0	8,1 b	2,89 a
13	22	54,5	60,5	81,8	40,0	21,2 f	4,05 a
14	63	84,0	91,5	71,8	86,7	7,1 a	3,7 a
15	59	84,5	96,5	72,3	40,0	24,9 g	7,67 c
16	61,5	89,0	91,0	88,2	40,0	12,6 e	5,64 b
17	67,5	87,5	78,0	75,0	40,0	13,2 e	4,06 a
18	29,5	67,0	80,5	96,3	86,7	20,4 f	4,5 a
19	38	74,5	82,5	78,8	86,7	10,3 d	3,92 a

1- % Germinación a los 10, 15 y 21 días de sembrados; 2- % de supervivencia luego del trasplante a maceta; 3- % de prendimiento de estacas; Altura (cm)= Altura del plantín a los 30 días. Letras distintas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

En esta etapa de plantín se observó una correlación positiva entre el carácter altura de plantín (Altura) y el carácter área foliar (AF), los cuales son indicadores de mayor tamaño de planta y mayor fitomasa, destacándose las Familias 6, 15, 10, 13 y 18; presentando sólo dos de ellas (Familia 15 y 10) buenos porcentajes de germinación a los 15 y 21 días de la siembra. Por el contrario las Familias 7, 11, 12 y 14, fueron las de menor altura de plantín, pero a su vez presentaron altos porcentajes de germinación.

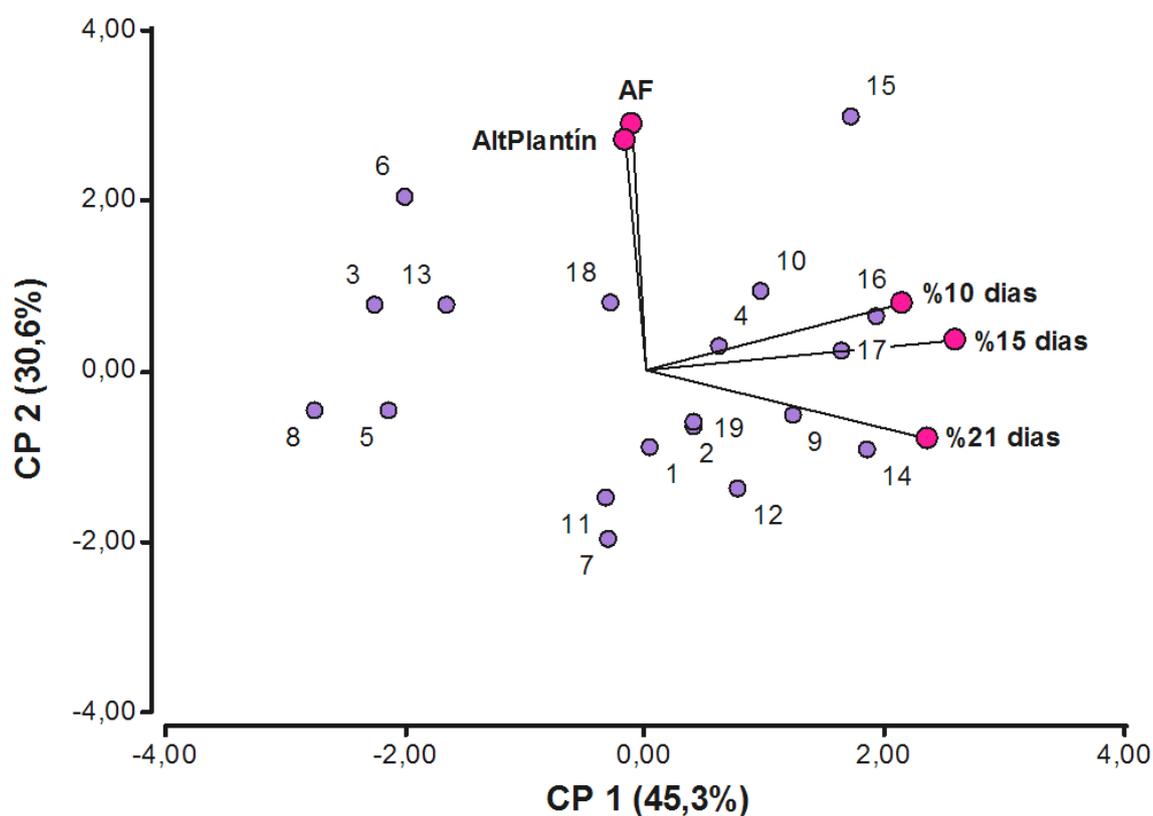


Figura 3.8: Análisis de Componentes principales de caracteres cualitativos en plantines derivados de plantas madres (PM) selectas. Los puntos representan 19 Familias de plantines evaluados y los vectores representan las variables medidas.

El análisis de conglomerados (Análisis de conglomerados jerárquico, método del ligamiento promedio con distancias euclídeas. Correlación cofenética: 0, 831) con todos los caracteres evaluados diferenció a las familias, destacándose la Familia 15 al separarse del resto que conforman a su vez dos grupos, el primero constituido por las Familias 6, 5, 3, 18, 8 y 13, y un segundo grupo con las Familias 7, 11, 17, 16, 2, 12, 9, 10, 14, 4, 19 y 1.

El agrupamiento de las familias en el ACP con los caracteres de mayor peso (Fig. 3. 8) fue congruente con el obtenido en el análisis de conglomerados realizado con todos los caracteres evaluados (Fig. 3.9).

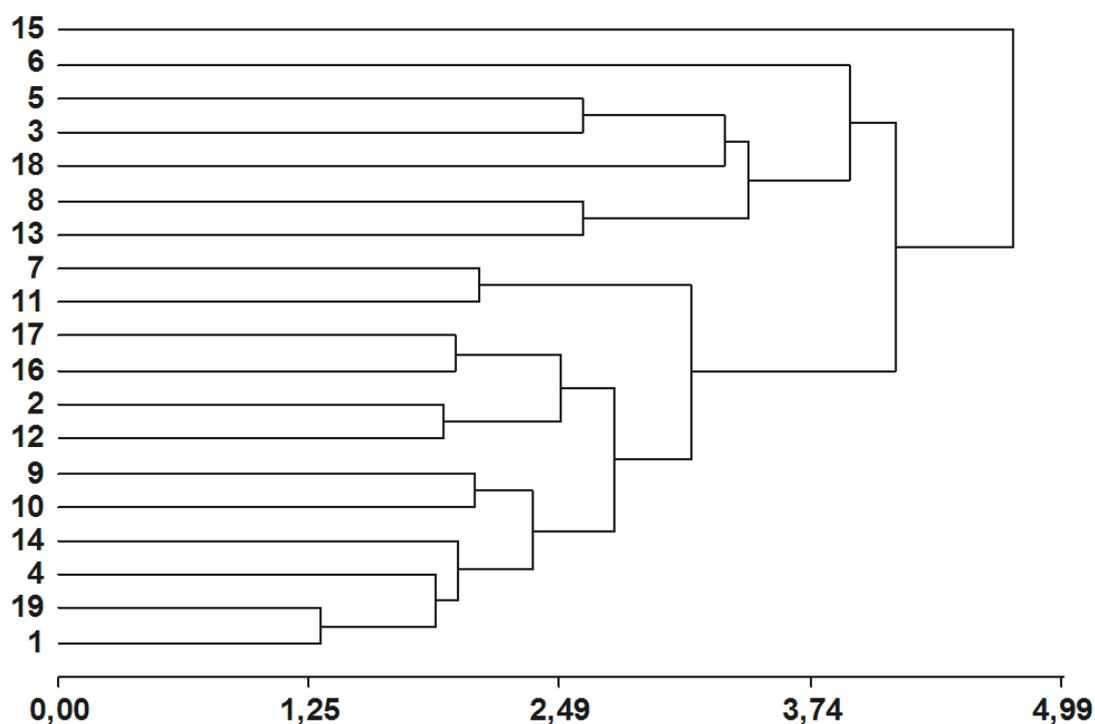


Figura 3.9: Análisis de conglomerados agrupando a Familias de plantines por caracteres evaluados.

Caracterización y Evaluación de las familias a campo

Los datos registrados se presentan en sus valores medios en la Tabla 3.2 para poder así caracterizar la variabilidad dentro y entre las familias estudiadas a través de todos los caracteres evaluados.

A partir del análisis de la varianza se observaron diferencias significativas entre las familias en la mayoría de las variables cuantitativas medidas.

En cuanto a la longitud de la rama más larga, medida antes de la cosecha, la Familia 5 se destaca significativamente del resto, mostrando la mayor altura promedio, con 124,36 cm.; seguida por un segundo rango con un grupo de las Familias 1, 3, 7, 11, 13, 15, 16, 18 y 19, con valores entre 95- 112 cm de altura (Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Valores medios de las variables medidas en 19 familias provenientes de plantas madres selectas.

Familia	Altura (cm)	Área Foliar¹	Peso Fresco (PF gr)	Peso Seco (PS gr)	Síntomas de Virus²	% Superviv³	Nº Ramas	Rto. AE Familia
1	101,03 b	6,67 g	434,07 a	116,85 a	0	83,33 d	59,33	1,29 a
2	74,20 a	7,81 i	405,2 a	180,27 a	0	100,00 e	45,67	1,39 a
3	96,03 b	5,54 e	488,6 b	136,19 a	0	66,67 c	38,67	1,43 a
4	70,70 a	4,83 d	455,03 a	189,59 b	0	100,00 e	40,67	2,84 b
5	124,36 c	4,27 c	587,4 b	204,69 c	0	83,33 d	57,00	3,28 c
6	81,20 a	7,01 h	368,8 a	134,89 a	1	50,00 b	42,33	1,13 a
7	108,20 b	7,36 h	560,53 b	167,59 a	0	33,33 a	48,33	0,87 a
8	70,20 a	6,07 f	441,87 a	121,99 a	1	66,67 c	38,67	1,15 a
9	71,86 a	7,72 i	396,3 a	152,09 a	0	100,00 e	37,67	1,38 a
10	68,86 a	6,45 f	524,23 b	187,49 b	0	50,00 b	41,67	1,12 a
11	96,86 b	6,06 g	251,23 a	119,29 a	1	100,00 e	45,00	1,2 a
12	90,03 a	4,82 d	518,93 b	155,59 a	0	100,00 e	55,00	2,46 b
13	95,53 b	4,83 d	390,43 a	143,89 a	1	100,00 e	43,33	1,28 a
14	87,03 a	5,31 e	497,1 b	129,19 a	0	100,00 e	47,67	1,53 a
15	111,86 b	6,49 g	354,2 a	153,19 a	0	100,00 e	39,33	1,59 a
16	102,53 b	5,28 e	407,83 a	171,29 a	0	66,67 c	40,67	2,87 b
17	76,86 a	3,79 b	378,57 a	187,99 b	0	83,33 d	53,33	2,25 b
18	102,53 b	5,15 e	280,13 a	162,69 a	1	100,00 e	57,33	1,27 a
19	104,36 b	3,39 a	324,57 a	151,19 a	0	83,33 d	45,33	1,63 a

1- Valor medio de Área foliar antes de la floración; 2- Síntoma de virosis: Presencia=1 y Ausencia=0; 3- % de supervivencia de clones de planta madre a campo; Altura (cm)= Altura de la rama más larga antes de cosecha del cultivo. Letras distintas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

Respecto al rendimiento en peso fresco a cosecha, las Familias 3, 5, 7, 10, 12 y 14 fueron las que se destacaron por su mayor producción de biomasa fresca, seguidas por el resto de las Familias las cuales no mostraron entre ellas diferencias significativas.

En relación al peso seco, nuevamente la Familia 5 se diferencia significativamente del resto por su mayor rendimiento en biomasa seca, seguida por las Familias 4, 10 y 17 en un segundo nivel.

Estas diferencias significativas observadas entre las familias también podrían analizarse teniendo en cuenta la relación hoja/tallo, discriminando al rendimiento en PS en peso seco de las hojas separadas de los tallos. Esta variable podría ser de importancia, según Franz y Novak (Franz y Novak, 1997), también a la hora de estimar rendimientos dado que son justamente las hojas las partes de la planta que mayormente se destinan al consumo.

En cuanto al rendimiento en aceites esenciales (Tabla 3.2), se pueden distinguir 3 grupos entre las Familias evaluadas. El primer grupo mostró un rendimiento promedio de 1,31% e incluye a las Familias 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 18 y 19; el segundo grupo incluye a las Familias 4, 12, 16 y 17, con un rendimiento promedio de 2,61%; y el tercer grupo o nivel lo da la Familia 5 con un rendimiento promedio del 3,28%.

Para la evaluación de sanidad en relación a la presencia o ausencia de síntomas de virosis *CMV*, se observaron plantas sintomáticas en las Familias 6, 8, 11, 13 y 18 (Tabla 3.2 y Fig. 3.10). No se observaron diferencias significativas entre las Familias en cuanto al número de ramas por planta.

Del Análisis de Componentes Principales (ACP) considerando sólo las variables destacadas, se observa que el 73,9% de la variabilidad total es explicada por el primer plano factorial (CP 1 y CP 2), (Figura 3.10). A nivel de la CP 1, componente que explica por sí sola el 46,8% de la variabilidad total, las variables con mayor peso fueron el peso seco (PS), el contenido de aceites esenciales (Rto. AE) y la presencia de Síntomas de virosis (Virus). A nivel de la CP2, las variables con mayor inercia son el porcentaje de supervivencias de plantines clonales a campo (% SupervCampo) y el peso fresco (PF).

Las variables cuantitativas utilizadas para el ACP son aquellas que mejor caracterizan a las 19 familias evaluadas, permitiendo discriminar aquellas familias que muestran presencia de síntomas de virus *CMV* y/o menor supervivencia a campo. Considerando estas variables, se observa que se forman dos grupos de familias en relación a estos caracteres: Las Familias 6, 8, 11, 13 y 18, con presencia de síntomas de virosis y las Familias 7 y 10 con menor supervivencia a campo.

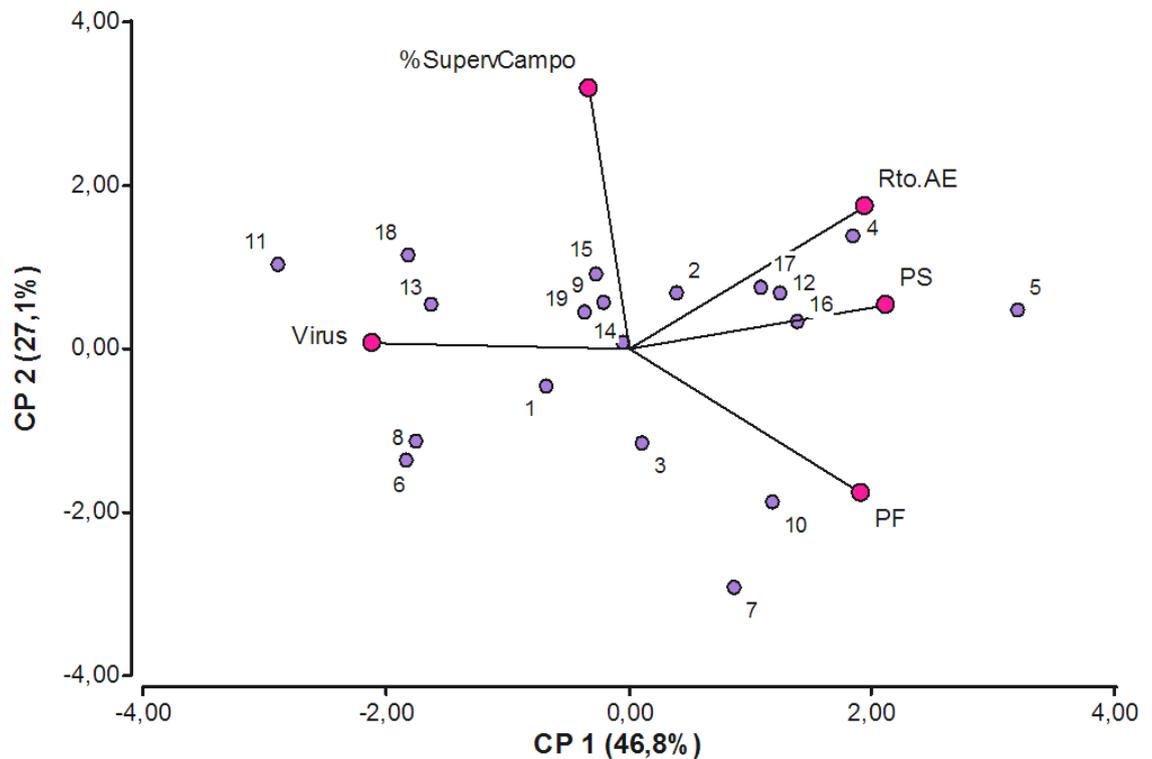


Figura 3.10: Biplot según el plano conformado por las dos primeras componentes principales (CP1 y CP2), donde los puntos representan 19 Familias evaluadas y los vectores representan las variables medidas.

Al realizar un análisis de conglomerados jerárquicos, por el método del ligamiento promedio utilizando distancias euclídeas (Fig. 3.11), se encontró que la Familia 5 se diferencia del resto. Esta Familia en los análisis de componentes principales con los caracteres evaluados a campo, se diferenció por mayor rendimiento en PS, PF y AE. Posteriormente, se puede diferenciar un grupo constituido por las Familias 7, 10, quienes presentaron un menor porcentaje de supervivencia a campo. Otro grupo se encuentra constituido por las Familias 8, 6, 18, 13 y 11, familias que presentaron síntomas de virosis entre sus ejemplares, separándose del resto de las familias.

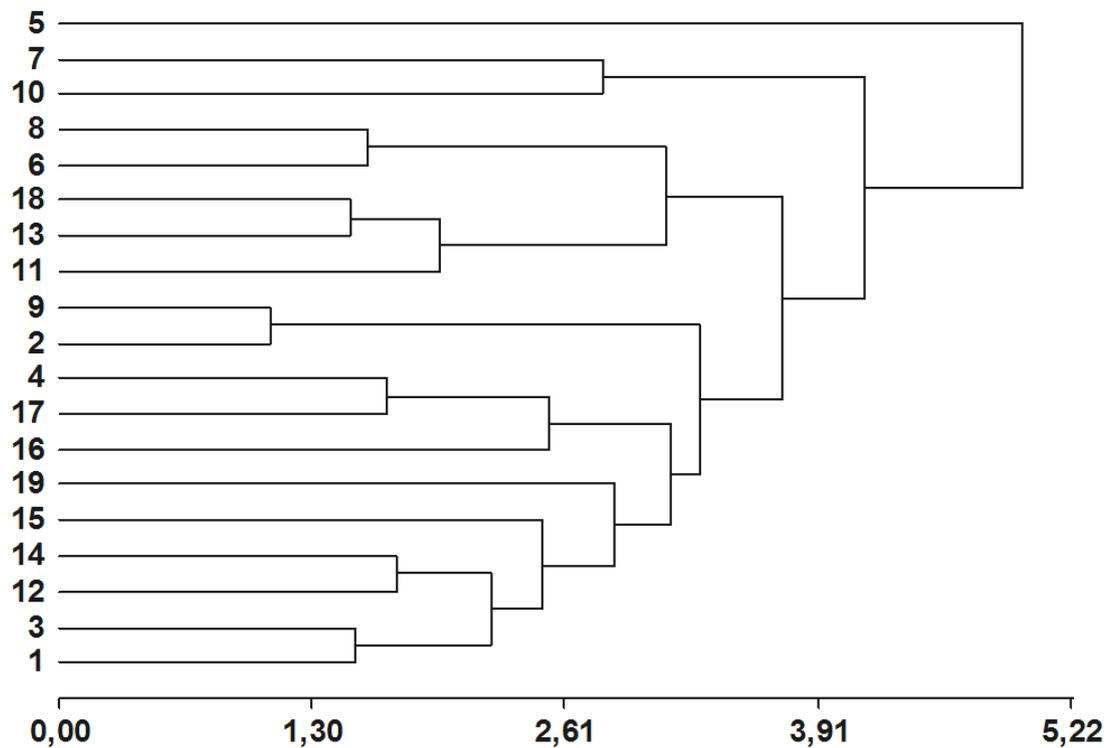


Figura 3.11: Agrupamiento de Familias de peperina (*Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling) por conglomerado jerárquico dado por las variables evaluadas en plantas a campo.
 Corelación cofenética: 0,818.

Parámetros genéticos

Como se desprende de los párrafos anteriores, con los resultados del ensayo se pudo estimar el error experimental a través de las repeticiones y la partición de la varianza fenotípica permitió estimar los valores de heredabilidad para cada carácter. La componente ambiental se estimó a partir de la varianza de las plantas dentro de clones, mientras que la componente genética se estimó a partir de la diferencia entre la varianza fenotípica total y la varianza ambiental. Las pruebas multivariadas mostraron diferencias significativas para todos los caracteres y la varianza ambiental fue superior a la genética también para todos los caracteres evaluados (Tabla 3.3). La heredabilidad en sentido amplio varió entre 0,19 y 0,43. La variabilidad detectada y la alta heredabilidad mostrada por algunos caracteres resultaron de interés para continuar con el programa de selección propuesto.

Tabla 3.3: Heredabilidad de los caracteres productivos y varianzas que lo determinan: Varianzas genética, ambiental y Heredabilidad en sentido amplio.

Variable	Varianza Genética	Varianza Ambiental	Heredabilidad sentido amplio
PS	611,99	2478,09	0,19
Altura	217,63	282,26	0,44
Nº R	142,47	409,53	0,26
PF	5171,66	7655,70	0,40

Peso Seco (PS), Longitud de rama más larga (Altura), Número de ramas (Nº R) y Peso fresco (PF).

Familias Selectas

Para la selección de las Familias caracterizadas en este ensayo a campo, se tomó como criterio descartar dentro de las 19 Familias evaluadas, las Familias 6, 7, 8, 10, 11, 13 y 18 por presentar síntomas de virosis y/o por bajo porcentaje de supervivencia a campo. El grupo de las 12 familias restante se utilizó para la extracción de aceites esenciales y su posterior caracterización a través de GC-MS (descrito anteriormente); para con ellas continuar las siguientes etapas de la investigación.

CONCLUSIONES

Esta etapa del trabajo permitió detectar variabilidad y un componente genético alto para los caracteres evaluados, resultando muy promisorios para continuar con el programa de selección orientado a la mejora genética de la peperina.

En este sentido, estos resultados muestran variabilidad tanto entre familias como dentro de cada una de ellas en distintas proporciones. Es de interés remarcar que en muchos ejemplares entre las distintas familias, tanto en plantas adultas como en la etapa de plantín, los caracteres componentes de rendimiento muestran valores medios superiores en relación a estos mismos caracteres en las poblaciones iniciales del cultivar Champaquí-FCA.

La variabilidad observada entre las familias derivadas de individuos selectos, constituidos en plantas madres (PM), muestra una variación que permite proseguir con

trabajos de mejoramiento genético, esperando buena respuesta a la selección fundamentalmente en los caracteres peso fresco y seco, altura de planta, número de ramas y de rendimiento y composición en aceites esenciales (AE).

Se verificó un gran porcentaje de germinación no siendo necesario realizar en las semillas tratamientos adicionales de pregerminación.

Para la producción de plántulas en condiciones de invernadero, se observó una buena respuesta en el desarrollo de las plántulas.

La multiplicación por estacas presentó una gran variación entre las PM selectas, pudiéndose diferenciar algunas como poco adaptadas a este tipo de reproducción.

Cuando se compararon las distintas familias derivadas de las PM selectas, las Familias 5, 7, 10, y 12, resultaron las más productivas, diferenciándose de las restantes tanto por peso fresco como por peso seco de las plantas. A nivel general, se observó buena respuestas al cultivo en cuanto a producción de biomasa por planta.

Sería importante tener en cuenta la evaluación del porcentaje de agua que pierden las plantas durante el secado ya que este aspecto es de importancia en su relación con el rendimiento de peso seco. En las condiciones planteadas en el ensayo (como por ejemplo distancias de 0,70 m entre surcos y 0,50 m entre plantas), se observó también que la relación hoja/tallo y la Longitud de entrenudos, serían variables de importancia a ser discriminadas ya que se observaron familias con valores altos en altura de planta a cosecha (AltCosecha) no correlacionándose con mayores rendimientos en PF y/o PS u área foliar (AF).

Para el carácter Altura a cosecha, se observaron diferencias significativas entre las familias, pero su valor medio general fue marcadamente inferior al valor medio de la población que les dio origen. Siete familias presentaron un mérito genético superior a la media inicial, pero once familias se encontraron por debajo de este valor. La mayoría de las familias tuvieron ramas menos largas que las plantas selectas que les dieron origen.

Con respecto a las superficies de las hojas se observaron diferencias significativas entre familias y se encontraron valores superiores a la media de las plantas selectas de la población inicial.

En cuanto al peso fresco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre familias. El peso fresco de plantas es un carácter importante para la determinación del rendimiento. En este caso quince familias mostraron un peso con un mérito genético superior a la media inicial y sólo cuatro familias se diferenciaron con valores menores (Familias 6, 11; 15 y 18).

El peso seco también mostró diferencias significativas entre familias, y sólo diez de ellas con un mérito genético superior a la media, presentando entre las familias un valor medio inferior al de la población inicial.

Respecto al rendimiento de aceite, todas las familias se diferenciaron significativamente de la media general de la población inicial. Al respecto es de destacar la producción de aceite en las familias 5, 12, 16 y 17, cuyos valores estuvieron muy por encima del promedio (1,68 %). Esta variable es la que Ojeda (Ojeda, 2004) presenta con mayor valor de heredabilidad en sentido amplio (0,74), por lo que se infiere que es factible esperar una adecuada respuesta en el mejoramiento del rendimiento de aceite mediante métodos de selección basados en este carácter.

El porte de las plantas no mostró capacidad discriminante entre los materiales. Se considera que al ser materiales derivados del cultivar Champaqui-FCA, este carácter no mostró diferencias, ya que la totalidad de plantas que finalizaron su ciclo de cultivo presentaban el tipo de porte erecto. Sólo materiales utilizados como borduras, se manifestaron con ramificaciones rastreras hacia las afueras del ensayo, al contar con el espacio sin limitantes.

De las observaciones de síntomas de enfermedades durante el ciclo de cultivo, se observó, en individuos de distintas familias, la sintomatología correspondiente a la presencia del *Cucumber mosaic virus* (CMV) ocasionando daños en hojas y el crecimiento de las plantas. Es de destacar que ante la presencia del CMV se observó un comportamiento diferencial entre las familias, ya que de las 19 familias evaluadas, sólo

5 (cinco) de ellas manifestaron la sintomatología, pero en ninguna familia las plantas derivadas de estacas de las plantas madres manifestaron la virosis, lo cual evidencia una posible resistencia al virus.

La culminación de esta etapa permitió obtener los datos necesarios para realizar la selección de individuos que responden a las características buscadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbot, L. y Pistorale, S. 2010. Determinación de componentes de la varianza y heredabilidad en cebadilla criolla (*Bromus catharticus* Vahl.). Agriscientia, XXVII (2): 115-123.
- Abbot, L. y Pistorale, S. 2011. Análisis de la estabilidad y adaptabilidad de caracteres de interés agronómico en genotipos selectos de cebadilla criolla (*Bromus catharticus*). Agriscientia. Vol. XXVIII (2): 109-117.
- Allard, R. W. 1960. Principles of Plant Breeding. John Wiley & Sons Ed. London, 485 pp.
- Allard, R. W. and Bradshaw, A. D. 1964. Implications of genotype environmental interactions in applied plant breeding. Crop Science 4: 503-508.
- Borém, A. e Miranda, G. V. 2009. Melhoramiento de plantas. Viscosa, Ed. UFV, 529 pp.
- Campbell, B. T. and Jones, M. A. 2005. Assessment of genotype x environmental interactions for yield and fiber quality in cotton performance trials. *Euphytica* 144: 69-78.
- Cubero, J. I. 1999. Introducción a la Mejora Genética Vegetal. Ed. Mundi-Prensa. España, 365 pp.
- Chaves, L. J. 1997. Propiedades requeridas en la Población Base. En: Selección recurrente en arroz. Ed. Elcio P. Guimarães, Cali, Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical. 240 pp.
- Chaves, L. J. 2001. Interacao de genotipos com ambientes. In: Recursos Genéticos e Melhoramiento de plantas. (Eds). Nass, I. L.; Valois, A. C.; Melo, I. S.; Valadares Inglis, M. C. Fundacao MT, Rondonópolis, pp. 673-713.
- Ferreira, D. F.; Demetrio, C. G. B.; Manly, B. F. J.; Machado, A. A. and Vencovsky, R. 2006. Statistical models in agriculture: biometrical methods for evaluating phenotypic stability in plant breeding. *Cerne* 12:373-388.
- Franz, C. and Novak, J. 1997. Breeding of *Origanum* species. In: Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano. S. Padulosi (ed.). CIHEAM, Valenzano, Bari, Italy, pp 49-56.
- Hartwig, I.; González da Silva, J.A.; Félix de Carvalho, F.I.; Costa de Oliveira, A.; Bertan, I.; Pires Valério, I.; Olegário da Silva, G.; Ribeiro, G.; Finatto, T. e da

- Silveira, G. 2007. Variabilidade fenotípica de caracteres adaptativos de aveia branca (*Avena sativa* L.) em cruzamentos dialélicos. *Ciência Rural* 37:337-345.
- InfoStat 2013. InfoStat versión 2013. Grupo *InfoStat*. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Jaramillo, S.M. y Baena, M. 2000. Material de apoyo a la capacitación en conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Cali, Colombia.
- Lin, C. S.; Binns, M. R. y Lefkovitch, L. P. 1986. Stability analysis: where do we stand. *Crop Science* 26:894-900.
- López, C.; Moglia, J.; Navall, M.; Ewens, M. y Bravo, E. 2003. Evaluación de la variación genética de especies del género *Prosopis* de la región chaqueña Argentina para su conservación y mejoramiento. *Mejores árboles para más forestadores*, 3:195-203.
- Molina, G.J.D. 1992. Introducción a la Genética de Poblaciones y Cuantitativa (algunas implicaciones en genotecnia). AGT Editores. DF., México, 349 pp.
- Muñoz, F. 2000. Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado. Mundi-Prensa; España; 336 pp.
- Nyquist, W.E. 1991. Estimation of heritability and prediction of selection response in plant populations. *Critical Reviews in Plant Science* 10(3):235-322.
- Sobierajski, G.R.; Kageyama, P.Y. and Sebbenn, A.M. 2006. Estimates of genetic parameters in *Mimosa scabrella* populations by random and mixed reproduction models. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 06:47-54.
- Vencovsky, R. y Barriga, P. 1992. Genética Biométrica no fitomelhoramiento. Ribeirao Preto, *Revista Brasileira de Genética*, 496 pp.
- Vilela Morales, E. A.; Valois, A. C. y Nass, L. 1997. Recursos genéticos vegetales. EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEN. 78 pp.
- Wricke, G. and Weber, W. E. 1986. *Quantitative Genetics and Selection in Plant Breeding*, Walter de Gruyter Ed., Berlin, New York, 302 pp.

EVALUACIÓN SENSORIAL

INTRODUCCIÓN

La evaluación sensorial es una disciplina científica mediante la cual se evalúan las propiedades organolépticas de un producto a través del uso de los sentidos humanos (Villarroel *et al.*, 2003).

Para los consumidores, los atributos más importantes de un producto lo constituyen sus características organolépticas. Son éstas las que determinan las preferencias individuales y su grado de aceptación (Torricella, *et al.*, 2007; Villarroel *et al.*, 2003). La forma más directa de medir la aceptación de un producto es mediante la evaluación que el hombre realiza de las propiedades organolépticas de dichos productos (aroma, color, aspecto, sabor), y esto es a través de la evaluación sensorial (Espinosa Manfugás, 2007; Torricella *et al.*, 2007; Zamora, 2007).

Actualmente se considera a la evaluación sensorial una herramienta imprescindible que permite obtener información sobre los aspectos de la calidad y/o aceptación de un producto, a los que no se puede tener acceso con otras técnicas analíticas o más sofisticadas (Zamora, 2007). De esta forma, mediante la evaluación sensorial pueden clasificarse los distintos materiales obtenidos en este trabajo, conocer la opinión sobre cada familia o población de peperina, su aceptación o rechazo, así como también su nivel de agrado e importancia.

En general el Análisis Sensorial es usado para medir la relación entre los índices sensoriales del producto y las especificaciones sensoriales que se desea obtener.

La calidad de un producto puede ser definida como el conjunto de aquellas características que diferencian unidades individuales del mismo y tienen significación en la determinación del grado de aceptabilidad de esta unidad por el consumidor. Así, la calidad total de un producto, debe ser analizada por los atributos que la componen, cada uno de los cuales debe ser medido y controlado independientemente. Mientras más

completa y precisamente se pueda definir un atributo, mayor es la probabilidad de obtener un método instrumental satisfactorio para su medición (Zamora, 2007).

La complejidad de las respuestas sensoriales es debida a la integración simultánea de señales múltiples (aspecto, olor, gusto, textura, sonido, etc.), las cuales el juez asocia con su experiencia pasada, los efectos contextuales y su anticipación a la emisión de su juicio.

Los sentidos se pueden dividir en dos grupos:

1) Los físicos, en los que el estímulo es físico (vista, audición, tacto, temperatura), y;

2) Los químicos, en los que se tiene que establecer un contacto entre las moléculas de algunas especies químicas particulares y un órgano o receptor de algún tipo que recibe el estímulo.

Zamora (2007) explica que los estímulos para los sentidos físicos presentan la distinción importante de permitir la medición instrumental, ya sea cuantitativa o cualitativa. Hay quienes no perciben los colores o presentan ceguera a determinados colores, otras no perciben algún sonido, algunas tienen un sentido inverso de la temperatura, pero existen instrumentos que indicarán justamente las longitudes de onda de la luz o el sonido o las temperaturas que esas personas están experimentando. Con los sentidos químicos, no tenemos instrumentos disponibles. No existen instrumentos que midan lo dulce, lo salado, lo amargo; tenemos que disponer de palabras para identificar las sustancias químicas y estimar su intensidad.

La sensibilidad de los individuos a los estímulos químicos es altamente variable. Los niveles de umbral por debajo de los cuales la persona ignora cualquier estímulo, pueden extenderse sobre un rango considerable de concentraciones. Por eso es necesario conocer el umbral de percepción de los gustos y sabores relevantes en el producto en estudio.

La Evaluación sensorial necesita un vocabulario que permita la comunicación, de modo que una misma sensación sea expresada por todos con las mismas palabras. La

selección de los términos es importante ya que las personas perciben de forma distinta los estímulos y además tienden a sintetizar o integrar la percepción de varios de ellos y les es difícil su descripción fraccionada. Es por ello que la selección de los términos para identificar los atributos a analizar es clave en este tipo de análisis, y éstos tendrán que ver fundamentalmente con el objetivo de las evaluaciones y con el método descriptivo seleccionado.

Los factores que influyen en el desarrollo de descriptores en el análisis descriptivo son, fundamentalmente el objetivo de las evaluaciones y el método descriptivo seleccionado.

Para establecer la capacidad discriminatoria de un término lo más común es utilizar el Análisis de la varianza, para determinar si existen diferencias significativas entre varias muestras respecto a la característica que describe.

Factores que influyen sobre los resultados

Los catadores son los instrumentos de medición empleados en la evaluación sensorial y como tales, se espera que sean repetibles, exactos y precisos. La evaluación o respuesta que emiten los catadores ante un estímulo bajo determinadas condiciones no depende solamente de la naturaleza e intensidad del estímulo (que en este caso son: las características organolépticas del alimento que se evalúa, mas el efecto del medio que circunda al catador) sino también dependen de otros factores como: Patrones mentales de los catadores, información complementaria que reciben durante la prueba y atención durante la prueba.

Los patrones mentales se adquieren durante la vida, no se nace con ellos. Los gustos y preferencias se enseñan, ya sea de forma planificada, como por ejemplo, mediante la propaganda a la población o el adiestramiento de catadores; o espontánea como es la tradición, las costumbres o la práctica. Sin embargo, la modificación de los hábitos de consumo de la población ocurre solo de forma paulatina.

Es decir, que los hábitos regionales pueden ser considerados como establecidos y poco variables. Por tal motivo, cuando se quiere introducir determinado producto

nuevo es necesario realizar estudios de adaptación o preferencia para conocer el gusto de la población.

La información complementaria que reciben los catadores tiene una influencia directa sobre los resultados del ensayo; es indispensable evitar que con esta se ayude a los catadores a evaluar la muestra, es decir, solo se debe informar lo referente a los procedimientos del ensayo y la forma de calificación y no sobre el origen de la muestra que se evalúa. El grado de atención de los catadores desempeña un papel fundamental en la obtención de resultados confiables y objetivos (Zamora, 2007).

Pruebas sensoriales

Las pruebas sensoriales se clasifican en dos grandes grupos: pruebas analíticas y pruebas afectivas.

Las analíticas tienen un objetivo, la evaluación comparativa o descriptiva de la calidad mediante un grupo reducido de catadores experimentados, adiestrados o expertos, mientras que las afectivas, por el contrario, brindan información acerca de la preferencia o aceptación que tienen los consumidores por el producto que se evalúa, para lo que se debe trabajar con un gran número de degustadores no adiestrados, es decir, consumidores representativos de la población (Resurrección, 1998).

Como instrumento de estas pruebas sensoriales, la encuesta constituye una herramienta metodológica cuantitativa en la cual un grupo de personas seleccionadas responden a un mismo conjunto de preguntas previamente escritas en un cuestionario. El objetivo de esta técnica es obtener la información de una forma más precisa y sistemática posible, para luego realizar análisis cualitativos y cuantitativos sobre los datos aportados por los encuestados (Martin, 1995).

Utilizando estas herramientas que brinda la evaluación sensorial en esta instancia del trabajo se buscó evaluar la aceptabilidad o rechazo de los materiales obtenidos hasta el momento, en el proceso de selección, realizando análisis sensoriales de cada grupo de plantas en estudio. Para cumplimentar con este objetivo se llevaron a cabo encuestas en la comunidad de interés (pobladores serranos, recolectores serranos, pequeños productores y consumidores).

Objetivos específicos

- Evaluar las propiedades organolépticas del material obtenido a través de análisis sensoriales en las comunidades de interés: recolectores serranos de hierbas aromáticas y medicinales, pequeños productores artesanales, productores de aromáticas a pequeña escala y consumidores en general.
- Seleccionar individuos, siguiendo descriptores morfológicos, de rendimiento, de tolerancia a virus (CMV), de rendimiento en aceites esenciales y características organolépticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección del material a evaluar

Para la selección de las muestras a ser evaluadas en las pruebas sensoriales, se tomó como criterio, evaluar los perfiles cromatográficos de los aceites esenciales de las Familias selectas caracterizadas en los ensayos a campo.

Dentro de las 19 Familias evaluadas, se descartaron las Familias 6, 7, 8, 10, 11, 13 y 18 por presentar síntomas de virosis y/o por bajo porcentaje de supervivencia a campo. El grupo de las 12 familias restantes se utilizó para la extracción de aceites esenciales y su posterior caracterización a través de GC-MS (descrito anteriormente). Una vez obtenidos los AE y su caracterización, se eligieron los perfiles de interés de acuerdo a sus potenciales usos en relación a la bibliografía existente.

Análisis Sensorial

La prueba sensorial realizada es del tipo afectiva (Torricella *et al.*, 2007), ya que busca la información acerca de la preferencia o aceptación que tienen los consumidores por el producto que se evalúa. Para ello se elaboró una encuesta que tuvo en cuenta preguntas relacionadas con las distintas propiedades organolépticas de evaluación sensorial como el aroma y color de muestras de materia vegetal seca y el aroma de muestras de aceites esenciales (Ver anexo N° 1: Encuesta Organoléptica de Peperina).

A fin de evaluar el grado de aceptación de cada uno de los productos, se definieron categorías cualitativas (no me gustó, aceptable, bueno o muy bueno) para cada atributo sensorial evaluado. Resulta oportuno notar que dicha variable es de tipo ordinal ya que se trata de una variable cualitativa cuyas categorías, sin un significado numérico preciso, guardan una relación de orden. Por ello se transformó en una variable cuantitativa, asignándole a cada categoría un valor numérico según su orden creciente de aceptación (de uno a cuatro). De esta forma se establecieron los valores medios por atributo sensorial que fueron comparados entre los distintos materiales.

Para la evaluación sensorial, donde el instrumento de medida son los evaluadores sensoriales, es de suma importancia la normalización de las condiciones fisiológicas que rodean al grupo de personas que evalúan el producto (Espinosa Manfugás, 2007). Por ello se tuvieron en cuenta diversos aspectos: Los lugares de evaluación presentaban preferentemente paredes con colores claros y lisos, una iluminación en general uniforme o a la luz del día, sin ruidos que provoquen molestias o distracción a los evaluadores. En las salas de evaluación se dispuso de una mesa de tamaño adecuado donde se ubicaron las muestras con los elementos necesarios para su evaluación. Los AE se presentaron en frascos de vidrio color ámbar opaco, enumerados e identificados correctamente (Fig. 4.1). Las muestras de hojas secas se envasaron en bolsas de polietileno lineal de baja densidad (LLDPE, por sus siglas en inglés) con cierre tipo Ziploc, y al momento de la evaluación se presentaron en bandejas plástica correctamente identificadas.



Figura 4.1: Muestras de aceites esenciales y Material vegetal para la evaluación sensorial.

A cada encuestado previamente a la evaluación sensorial, se les explicó el porqué de la experiencia y se les comentó cómo completar la encuesta siguiendo el orden lógico de las preguntas. Se realizó una planificación del análisis sensorial y se asesoró sobre la posibilidad de evaluar los materiales varias veces, según su necesidad.

Al momento de completar las propiedades sensoriales se evaluó en primer lugar, el color de muestras de material vegetal seco, a manera visual, sin tener una escala de color como referencia. En segundo lugar, se pidió evaluar el aroma de esas muestras vegetales mediante los siguientes pasos: oler una muestra, luego dejar pasar un tiempo, hasta no sentir este olor y de ser necesario tomar agua. Así, se repitió el procedimiento sucesivamente para cada una de las muestras. Por último se valoró el AE. Se pidió oler cada AE intercalando un tiempo de 5-10 minutos y la toma de agua entre muestra y muestra.

También se indicó a los encuestados, cuando realizaban la evaluación al mismo tiempo, que no deben conversar entre ellos, manteniendo disciplina durante las evaluaciones. Una vez completada la encuesta se comentó el origen de cada una de las muestras evaluadas.

Los evaluadores fueron escogidos de acuerdo al requisito de consumir, de cualquier modo que sea, hierbas aromáticas y/o medicinales. Cumpliendo este requisito, el grupo de evaluadores se integró por recolectores serranos, productores de hierbas aromáticas en pequeña escala, estudiantes de nivel medio, familiares de estudiantes y profesores. En todos los casos de distintas edades y ambos sexos. Además de disponer del tiempo necesario para realizar dicha experiencia, se procuró que los encuestados mostraran preocupación e interés por la prueba sensorial, asegurando la fidelidad del procedimiento solicitado.

Análisis estadístico

En todos los casos se determinaron el promedio (M) y la desviación estándar (DE) de las mediciones hechas por triplicado, expresándose el resultado como (M±DE). Los datos presentados en la Tabla 4.1, fueron analizados usando el paquete estadístico InfoStat 2013, con el que se realizaron ANOVAs simples. La comparación de

promedios se efectuó según Tukey ($p \leq 0,05$). Posteriormente, la información sistematizada de estas encuestas se contrastó con los resultados obtenidos en laboratorio sobre las características cromatográficas de los aceites esenciales para poder así discriminar las características del perfil del AE de los materiales seleccionados por mayor aceptación entre los encuestados.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Selección del material a evaluar

Dentro de las 12 Familias evaluadas por el contenido cualitativo de los aceites esenciales, se observaron diferentes perfiles que presentaban entre 12 y 15 compuestos identificados en distintas proporciones. Para el análisis y comparación entre las familias, se tomaron los 10 compuestos de mayor frecuencia relativa entre todas las muestras evaluadas. Se pudo observar que los aceites esenciales estuvieron constituidos en su mayor proporción por mentona y pulegona, encontrándose estos compuestos en distintas proporciones. De acuerdo a los 10 compuestos seleccionados por mayor frecuencia relativa en la totalidad de las familias evaluadas, se identificaron cuatro perfiles cromatográficos que resultaron de interés (Fig. 4. 2).

Estos cuatro perfiles bien diferenciados, presentados por distintas familias, resultan de interés para ser utilizados en la evaluación sensorial por las marcadas diferencias en la proporción entre los componentes principales, mentona y pulegona. Los perfiles 1, 2 y 3 son los más representados entre las 12 familias evaluadas, mientras que el perfil 4 sólo lo presentó una familia (Familia 17).

Es importante la relación entre los dos compuestos principales del aceite esencial de la peperina, ya que en numerosos estudios y evaluaciones realizadas muestran la importancia de la especie como recurso interesante por sus propiedades biocidas e inmunológicas, en relación a estos dos compuestos fundamentalmente. Así, González y Marioli (2010) encontraron que de diez plantas probadas, el extracto de peperina fue el

más eficiente en la capacidad de inhibir el crecimiento de *Paenibacillus larvae*, una bacteria que amenaza las abejas en sistemas productivos de miel.

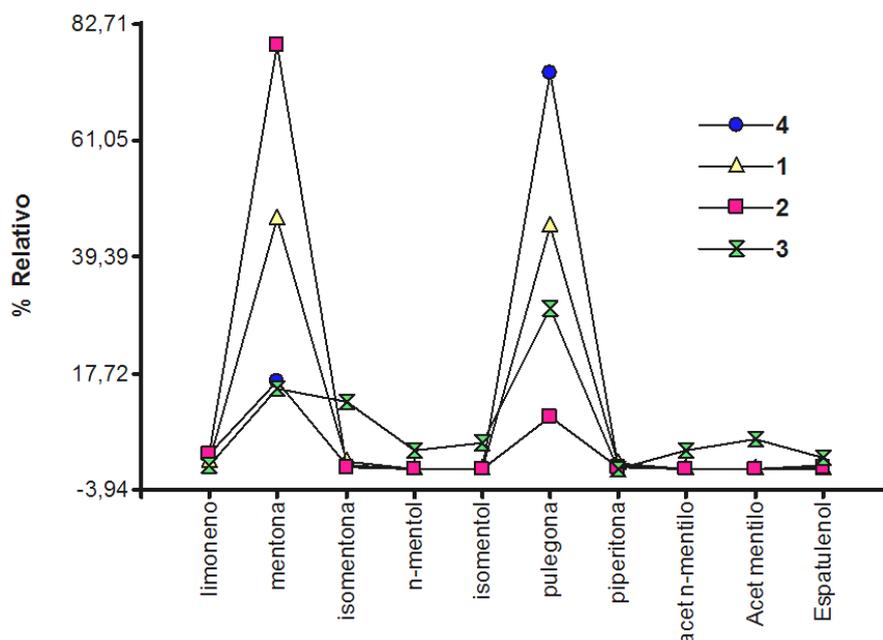


Figura 4.2: Porcentajes relativos de los compuestos mayoritarios en Aceites esenciales de cuatro muestras seleccionadas de peperina (*Menthastachys verticillata* (Griseb.) Epling).

Mora *et al.* (2009) examinaron el aceite esencial de esta especie y probaron su actividad antibacteriana *in vitro*. Las muestras utilizadas estaban conformadas por pulegona (55%) y trans-mentona (32%) y sus resultados mostraron tener un efecto inhibidor contra diversas bacterias.

Vogt *et al.* (2010) demostraron la actividad antiviral de los principales componentes del aceite (pulegona, mentona y limoneno), indicando además, que esta actividad se produce a concentraciones más bajas que las que tienen un efecto tóxico en las líneas de células tratadas *in vitro*. Además Sabini *et al.* (2010) mencionan que la replicación del virus del herpes simple es inhibida por los extractos de esta misma especie.

En pruebas de capacidad antioxidante de extractos de plantas, Dadé *et al.* (2009) mencionan a *M. verticillata* entre las plantas que mostraron ser eficientes.

Palacios *et al.* (2009) han puesto a prueba los aceites esenciales de nueve plantas, entre ellas *M. verticillata*, por su actividad insecticida contra la mosca doméstica común y encontraron que la peperina es la más eficaz de las nueve. Estos autores plantean que estos resultados pueden tener que ver con el hecho de que el principal componente del aceite utilizado en su estudio fue pulegona, sustancia tóxica, que comprende, por lo general, uno de los componentes mayoritarios en el aceite esencial de poblaciones silvestres.

Cariddi *et al.* (2009) han publicado un estudio sobre el efecto antialérgico *in vitro* del aceite esencial de peperina en las células de los pacientes alérgicos a los ácaros del polvo, donde el aceite esencial utilizado consistía de 63% pulegona, 16% de mentona y 2% de limoneno.

Maldonado *et al.* (2007) compararon el efecto del aceite esencial y la decocción de hojas, en la degranulación de los basófilos de pacientes alérgicos, al de varios fármacos antialérgicos *in vitro*. Las combinaciones de algunos de los medicamentos estándar eran más eficaces, pero los productos naturales también condujeron a una reducción significativa en la reacción alérgica. El aceite utilizado en el estudio era rico en pulegona (más del 60%) y mentona (14%).

Vogt *et al.* 2007 presentan resultados positivos en la inhibición del crecimiento de hongos del género *Fusarium* por extractos y aceites esenciales de *M. verticillata*. Cano Perez (2007), también publicó un estudio sobre los efectos antimicóticos de peperina, utilizando aceites dominados principalmente por pulegona y mentona.

En una evaluación de doce plantas aromáticas argentinas, *M. verticillata* mostró actividad repelente contra mosquitos (Gillij *et al.*, 2008). En el mismo sentido, Gleiser *et al.* (2007) y Batallán *et al.* (2008) publicaron estudios similares sobre la actividad insecticida del aceite de peperina contra distintas especies de mosquitos.

Es debido a estos antecedentes que los cuatro perfiles seleccionados resultaron de interés a ser evaluados; y de acuerdo a ello, se prepararon tanto las muestras de aceites esenciales, como las muestras de hojas secas para ser sometidas a los test sensoriales.

Análisis Sensorial

-Características de los evaluadores

Participaron del análisis sensorial del material seleccionado, un total de 86 personas (59 mujeres y 27 hombres).

Una primera instancia de evaluación, estuvo integrada por alumnos y familiares de la comunidad de Salsipuedes, Unquillo y Rio Ceballos (Provincia de Córdoba), junto a productores artesanales de las mismas localidades, catadores especializados y consumidores en general. Una segunda instancia de evaluación, se realizó con la participación de pobladores y recolectores de la Comunidad de San Jerónimo, de la provincia de Córdoba.

Las encuestas fueron realizadas en distintas oportunidades en un lapso de 2 meses aprovechando salidas de muestreo a campo y Jornadas-taller sobre Plantas aromáticas y medicinales nativas, llevadas a cabo en establecimientos educativos de la Localidad de Unquillo de la provincia de Córdoba, con la participación de toda la comunidad (alumnos, familiares, docentes y público en general). Con esta muestra, se procuró garantizar cierto nivel de conocimiento y relación con las plantas aromáticas, medicinales y/o condimenticias.

A modo de caracterización de los evaluadores, en la Fig. 4.3 se muestra las categorías de edades de los encuestados. Se aprecia que el mayor porcentaje (37,5%) corresponde a las edades entre 40 y 65 años, le siguen con un 25,0% entre 30 y 39 años; el 23,2% corresponde a edades entre 20 y 29 años y en menor porcentaje (14,3%) se encuentran los menores a 20 años de edad.

La mayoría de los encuestados conoce la planta de peperina, representando el 91,4%. Es de destacar que el 7,3% (de los que no conocen la planta en su estado natural), manifestó conocer la peperina sólo en forma de ataditos o ramilletes, como se comercializa tradicionalmente.



Figura 4.3: Gráficas de distribución de edades y sexo de los encuestados

De la totalidad de encuestados sólo el 3,49 % manifestó ser productor a pequeña escala de plantas aromáticas y medicinales (Fig.4.4). Pero el 36,05 % tiene alguna ocupación en relación con plantas aromáticas y medicinales (empleado en emprendimientos o viveros, recolector, herboristerías y pequeño productor).

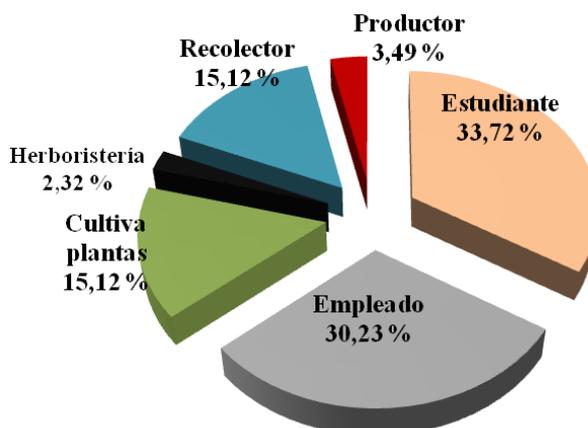


Figura 4.4: Porcentajes de Ocupación entre los encuestados.

Propiedades organolépticas

Cada atributo sensorial de las muestras evaluadas (aroma, color y aroma de AE) fueron comparados entre sí, realizando diagramas de barras para representar las distintas respuestas nombradas (frecuencias relativas) por los encuestados. Para una mejor interpretación, se optó por mostrar en gráficos separados las respuestas mencionadas para cada atributo.

Color: El color de los alimentos es la primera sensación que se percibe y es también el que a veces modifica subjetivamente otras sensaciones como el aroma y sabor.

Es necesario aclarar que el color puede ser medido en forma instrumental más efectivamente que en forma visual (Manresa y Vicente, 2007; Zamora, 2007). Si bien las medidas instrumentales de dicha propiedad sensorial se van incorporando de a poco al control de calidad alimenticio el uso de estos métodos requiere de equipos costosos (Gambaro y Giménez, 2001).

Manresa y Vicente, plantean que entre los factores del observador que pueden afectar la percepción y descripción del color se destacan el estado de ánimo y el nivel cultural del observador, por su relación con el dominio de un mayor o menor vocabulario (Manresa y Vicente, 2007). En relación a lo que plantean estos autores, en este trabajo se pudo observar la importancia del nivel de conocimiento o acercamiento con el uso de plantas aromáticas y medicinales que presentaba cada observador; y como el aspecto cultural o tradicional, fundamentalmente en el uso de la peperina, podría sesgar los resultados en este parámetro. Al ser la peperina tradicionalmente consumida y/o comercializada en ramilletes oreados, el observador reconoce ese “color” que presenta el ramillete como el color característico que debería tener cualquier muestra de peperina que se le presente.

Categorías de Color

En la valoración cualitativa del color para las muestras se puede ver en la Fig. 4.5 que las cuatro muestras presentan un mayor porcentaje en la categoría Buena (B); y las categorías con menores frecuencias fueron Mala (M) y Muy Buena (MB) también en todas las muestras.

Al comparar el valor promedio de las categorías de color entre las muestras, el test no evidenció diferencias significativas.

Resultan importantes estas apreciaciones ya que un color desagradable podría ser asociado por los evaluadores, inconscientemente, con un sabor o aroma desagradable, alterando entonces sus respuestas para dichas propiedades. Por ello el color es una característica del producto alimenticio que influye en el consumidor en el momento de aceptar o rechazar un alimento.

Por otra parte existen patrones específicos de color para otros productos alimentarios ampliamente extendidos como el caso de la miel. Sin embargo, cuando se trata de productos específicos de una determinada región, es difícil encontrar estándares que se ajusten a las necesidades particulares del producto (Hernández *et al.*, 2004).

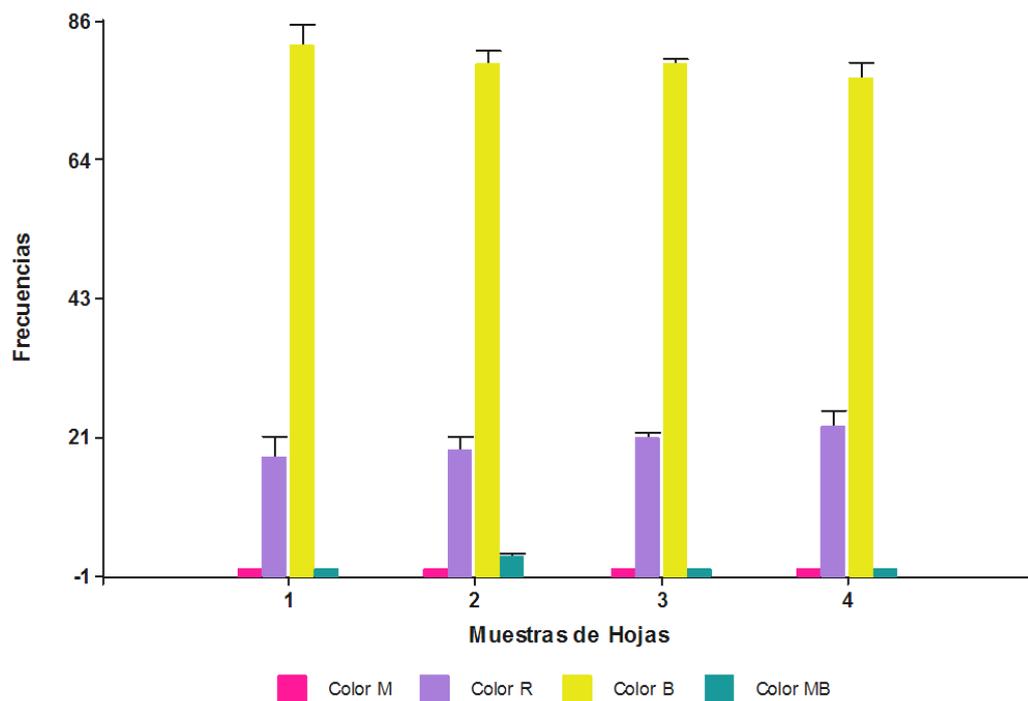


Figura 4.5: Frecuencias (%) para categorías de aceptación de Color de hojas secas en cuatro muestras de peperina.
M=malo; R=Regular; B=Bueno; MB=Muy Bueno

El color en los alimentos, depende fundamentalmente de las transformaciones que tienen lugar sobre los pigmentos propios o adicionados a los alimentos. Muchos de los cambios de color que ocurren durante la elaboración de los alimentos son característicos de los mismos y otros se deben a la degradación. Por ejemplo, algunos productos obtenidos a partir de las vainas de algarrobos han limitado su uso en la

industria alimentaria debido al color marrón oscuro y turbiedad que presentan (Larrauri y Saura, 2000). En este caso, el color del material seco depende fundamentalmente del proceso de secado, proceso clave a la hora de mantener el color, aroma y propiedades de las plantas aromáticas y medicinales.

Aroma: El aroma en esta tesis es considerado como sinónimo de olor y se refiere a la sensación producida por la liberación de gases del material (hojas o aceite esencial) inhalados por la nariz. Es importante esta aclaración ya que el concepto correcto de aroma es la sensación producida luego de la degustación (Espinosa Manfugás, 2007).

Una característica del aroma es la intensidad o potencia de éste. Además, la relación entre el aroma y el tiempo es muy importante, ya que el aroma es una propiedad sensorial que presenta dos atributos, contradictorios entre sí, en los cuales está involucrado el tiempo. El primero es la persistencia, es decir, que aún después de haberse retirado la sustancia olorosa, la persona continúa percibiendo el olor. Esto se debe a que las fosas nasales y la mucosa que recubre el interior de éstas quedan saturadas de la sustancia volátil. La otra característica, relacionada con la mente o con la zona olfatoria del cerebro, es el acostumbamiento a los olores después de un cierto tiempo.

Espinosa Manfugás (2007) postula que existen factores de carácter interno relacionados con las variables de cada individuo, como ser el estado fisiológico de la persona, el sexo, la edad, que pueden influenciar al percibir un aroma. También agrega que hasta el momento no se ha logrado clasificar cuales son los olores primarios.

Es importante tener en cuenta que dos individuos pueden caracterizar un mismo aroma con dos términos diferentes, o por el contrario citar el mismo término para describir dos aromas distintos.

En otros estudios realizados con diversas muestras de miel, se establece un banco de referencias olorosas a fin de establecer palabras elegidas para describir el aroma (Montenegro, *et al.*; 2008). De esta forma se precisa un vocabulario específico para definir dicha propiedad sensorial. Para ello previamente se deben realizar pruebas

para aprobar las referencias aromáticas estandarizadas que correspondan a cada aroma descripto (Gallez, 2006; Guyot Declerck, 2003). Sin embargo en estos casos, el aroma percibido durante la experiencia puede a veces no ajustarse a los descriptos y tiene que realizarse por aproximación perdiéndose la posibilidad de describir nuevos aromas.

En relación a lo que plantean estos autores es que en este trabajo se propuso realizar análisis sensoriales sólo del tipo afectivo, ya que de realizar pruebas descriptivas se requeriría evaluadores adiestrados y definir descriptores para cada uno de los atributos a evaluar, para lo cual no se contó con los recursos y el personal adecuado para realizarlo.

Categorías de Aroma de Hojas

Como se puede apreciar en la Fig. 4.6, la categoría de aroma con mayor frecuencia para las muestras fue Bueno en las Muestras 1, 2 y 3; y la Muestra 4 presentó mayor frecuencia en la categoría Regular. En todos los casos la categoría con menor frecuencia fue la de Malo.

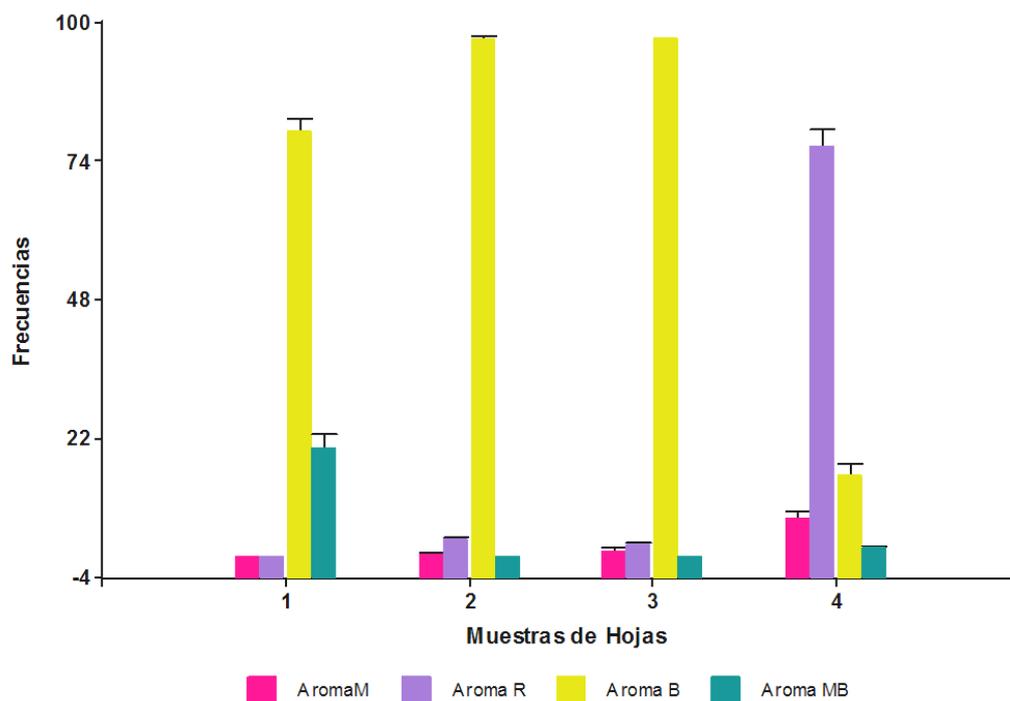


Figura 4.6: Frecuencias (%) para categorías de aceptación de Aroma de las hojas en cuatro muestras de peperina.

M=malo; R=Regular; B=Bueno; MB=Muy Bueno

Al realizar la comparación según el valor promedio de las categorías de aroma entre las muestras, el test evidenció diferencias estadísticas significativas (Test Tukey, $p \leq 0,05$) separando a la muestra N° 4 de las restantes, como puede observarse en la gráfica (Fig. 4.6).

Categorías de Aroma de Aceite Esencial (AE)

En la Fig. 4.7 se puede observar que para el atributo de Aroma del Aceite esencial, la categoría con mayor frecuencia para la muestra 3 fue Muy Bueno y para las muestras 1 y 4 fue Bueno, presentando la muestra 2 mayor frecuencia en la categoría Regular. En las muestras 1, 2 y 3 la categoría con menor frecuencia fue la de Malo y en la muestra 4 la categoría Muy Buena (Tabla 4.1).

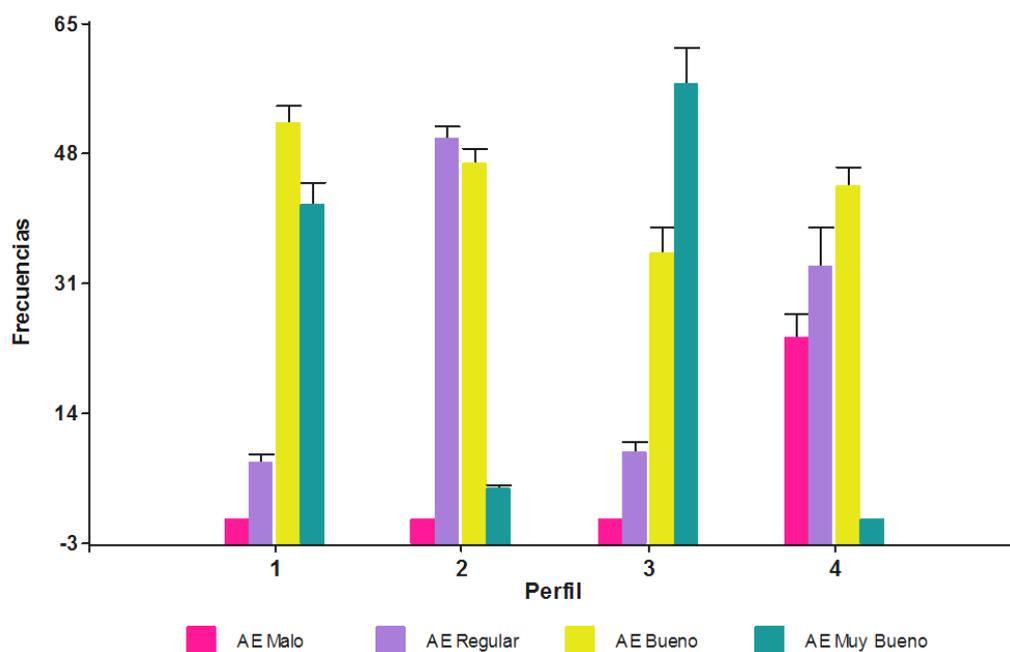


Figura 4.7: Frecuencias (%) para categorías de aceptación de Aroma de Aceite Esencial (AE) en cuatro muestras de peperina. M=malo; R=Regular; B=Bueno; MB=Muy Bueno

Integración de los atributos sensoriales de las muestras

La complejidad de respuestas sensoriales es debida a la integración simultánea de señales múltiples (aspecto, olor, textura, entre otras.), las que el degustador asocia

con su experiencia pasada, los efectos contextuales y su anticipación a la emisión de su juicio (Zamora, 2007).

El consumidor cuando acepta un determinado producto integra los distintos aspectos recogidos por los sentidos: vista (color y defectos), olfato (olor y aroma), tacto (manipulación manual). Todas estas propiedades organolépticas determinan la calidad del producto para el evaluador (Torricella *et al.*, 2007; Espinosa Manfugás, 2007). Las mismas fueron contempladas y valoradas por cada encuestado a la hora de decidir sobre la aprobación de cada una de las muestras. Por ello en la Fig. 4.8 se representaron todos los atributos sensoriales para cada una de las muestras según su grado de aceptación. Además, los valores medios y desvío estándar en la escala hedónica propuesta (de cuatro categorías: M, R, B y MB) se presentan en la Tabla 4.1 para cada uno de los atributos en las cuatro muestras evaluadas.

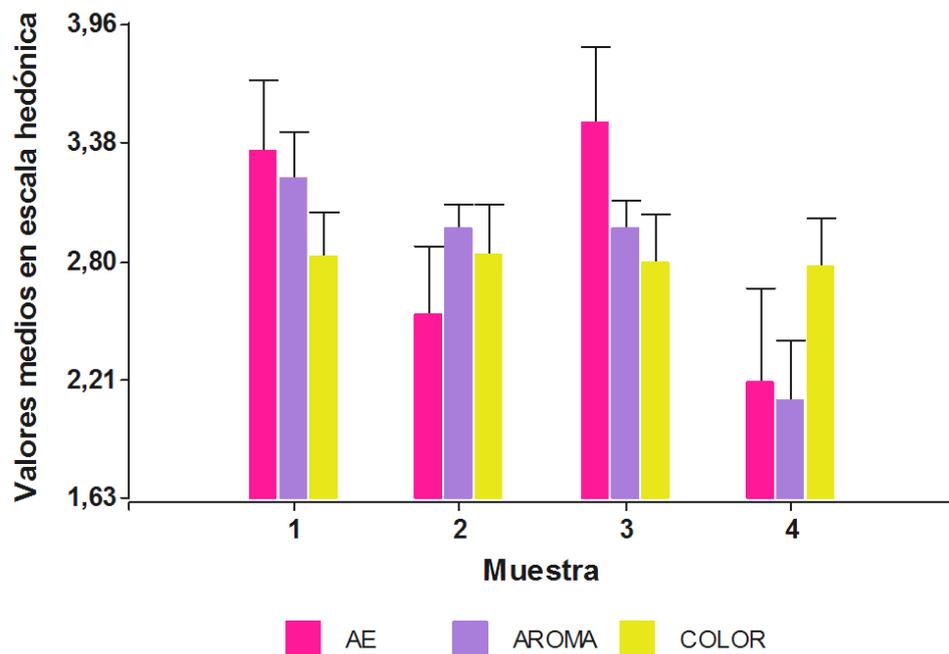


Figura 4.8: Valores medios para la categoría de aceptación de todos los atributos sensoriales evaluados en cuatro muestras de hojas y aceite esencial de peperina.

Tabla 4.1: Porcentaje de respuesta para cada categoría en escala hedónica y medias generales del color de hojas, aroma de hojas y aroma de aceites esenciales, en las evaluaciones sensoriales realizadas en cuatro muestras de materiales selectos de peperina (*Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling.

Porcentaje de las respuestas (%) en la evaluación sensorial												
	COLOR HOJA				AROMA HOJA				AROMA AE			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
M	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	1,00	7,00	0,00	0,00	0,00	23,67
R	17,67	18,67	20,67	22,67	0,00	3,00	2,00	76,67	7,33	49,67	8,67	33,00
B	82,33	79,33	79,33	77,33	79,67	96,67	97,00	15,00	51,67	46,33	34,67	43,33
MB	0,00	2,00	0,00	0,00	20,33	0,00	0,00	1,33	41,00	4,00	56,66	0,00
M ±	2,82±	2,83±	2,79±	2,77±	3,20±	2,96±	2,96±	2,11±	3,34±	2,54±	3,48±	2,20±
D.E.	0,388	0,420	0,410	0,420	0,400	0,210	0,240	0,510	0,610	0,570	0,650	0,800

*M=Media General significa que corresponde a las puntuaciones de todas las respuestas en la escala hedónica de 4 puntos: M= Malo (1); R= Regular (2); B= Bueno (3) y MB= Muy Bueno (4).

En la Fig. 4.8 se distingue que las muestras 1 y 3 difieren al menos en dos de los tres atributos evaluados; presentando las mayores frecuencias entre las categorías 3 (Bueno) y 4 (Muy Bueno) para aroma de hojas y aroma de aceites esenciales.

Las muestras 1 y 3 siguen un mismo patrón, con valores más bajos en categoría para el atributo color de hoja y más elevados para aroma de hojas y aroma de aceites esenciales.

En un análisis multivariado de Componentes principales (Fig. 4.9), el resultado obtenido muestra que el 80,7 % de la variabilidad observada entre las muestras fue explicada por las dos primeras componentes (CP1 y CP2). A nivel de la CP1, componente que explica el 56,2 % de la variabilidad total, los vectores con mayor inercia fueron Color de hoja Bueno y AE Malo; mientras que a nivel de la CP2 (componente que explica el 24,5 % de la variabilidad observada) las vectores que permitieron establecer diferencias entre las muestras fueron: Color de hoja Muy Bueno y AE MB. Esta gráfica muestra cómo se asocia un AE Malo con Aroma y Color de hoja Malo o Regular y asociado a una muestra, la N°4. Por otro lado una categoría de AE Muy Bueno se asocia a Color de hoja Bueno y Aroma Bueno y Muy Bueno y se asocia a las muestras 1 y 3, separándola netamente de las muestras N° 4 y N°2. La muestra N°2 se caracteriza por estar asociado a Color de hoja Muy Bueno pero AE Regular separándola de las otras muestras. Resultados congruentes con lo que describe la Fig.4.8.

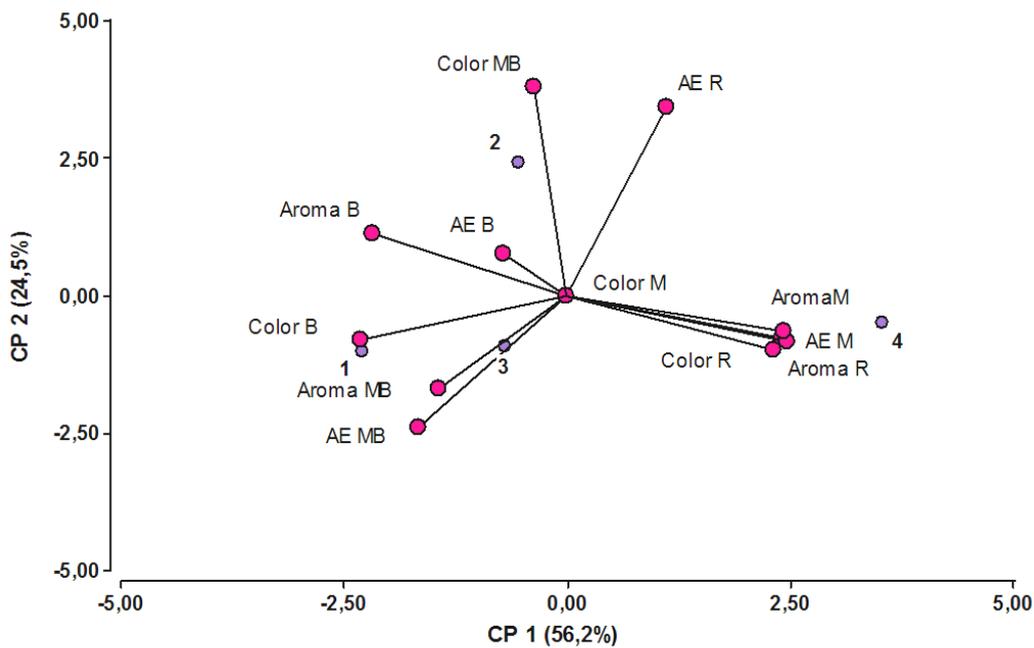


Figura 4.9: Componentes principales de los atributos evaluados. Los puntos representan las cuatro muestras y los vectores representan las categorías de los atributos evaluados.

Es importante recalcar el hecho de evaluar por separado cada aspecto sensorial entre las muestras, ya que algunos mencionaron que al evaluar un atributo se daban cuenta de que había diferencias con la apreciación sensorial observada anteriormente.

Por otra parte, la experiencia constituye una muy buena iniciativa para revalorizar las plantas nativas y los recursos naturales entre los consumidores. Además varios encuestados plantearon seguir experimentando, con otros productos o especies.

En esta investigación, resulta valioso el aporte de considerar a los futuros consumidores la posibilidad de experimentar con los materiales de selección en un plan de mejoramiento, además de remarcar la importancia de este tipo de análisis que junto a la caracterización química y morfológica son fundamentales para la aceptación del producto final en el mercado.

Dadas las características de importancia de los metabolitos secundarios de la especie, demostradas en una gran variedad de trabajos de investigación, es importante remarcar el rol que cumple tanto el cultivo, como el mejoramiento de poblaciones de la especie, a fin de dar respuesta a las necesidades de obtener material con características

destacadas. Por lo cual la experiencia aquí expuesta, además de ampliar el conocimiento sobre el cultivo de la peperina y analizar parámetros productivos, permite la posibilidad de satisfacer futuras demandas de la industria.

Perfil del AE de los materiales seleccionados

La información sistematizada de las encuestas se contrastó con los resultados obtenidos en laboratorio sobre las características cromatográficas de los aceites esenciales (Fig. 4.10), marcando así las características del perfil del AE de los materiales seleccionados por mayor aceptación entre los encuestados.

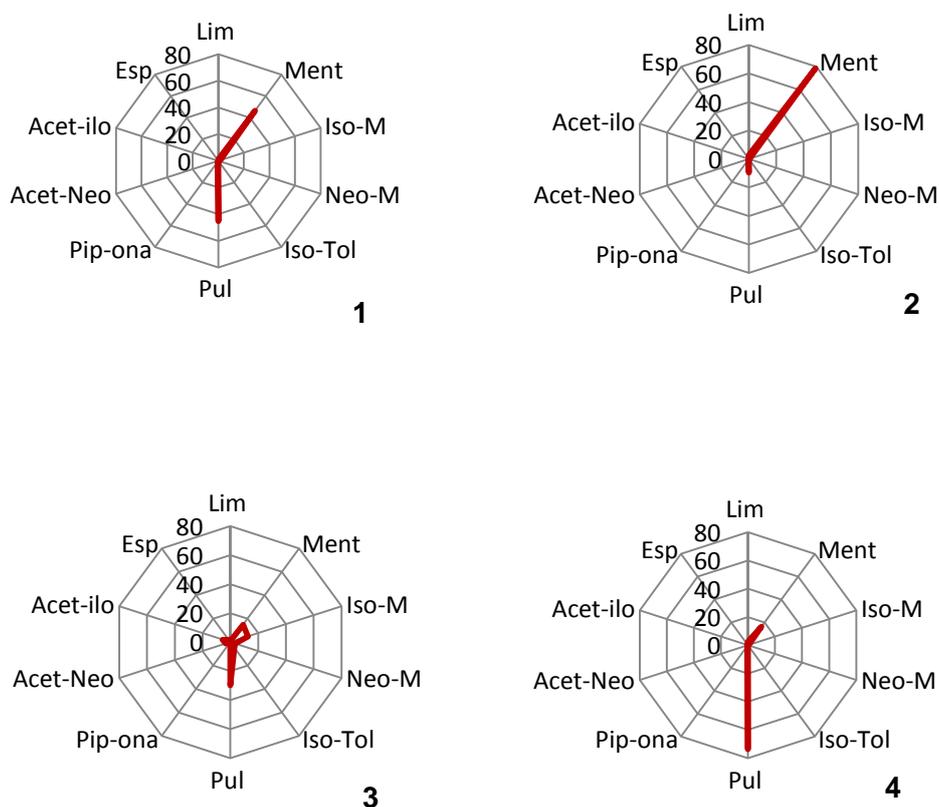


Figura 4.10: Porcentaje relativo de los compuestos mayoritarios del AE en cuatro de las familias mejoradas. Lim: limoneno, Ment: mentona, Iso-M: isomentona, Neo-M: neomentol, Iso-Tol: isomentol, Pul: pulegona, Acet-Neo: acetato de neo mentilo, Acet-ilo: acetato de mentilo, Esp: espatulenol.

En la Tabla 4.2 se resumen las características del aceite esencial de las cuatro familias utilizadas para la evaluación sensorial y su grado de aceptación en las pruebas sensoriales.

Tabla 4.2: Porcentajes de Mentona y Pulegona en Aceites esenciales (AE) de cuatro muestras de familias selectas en *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling “peperina” y categorías de aceptación en evaluación sensorial

Categoría	Muestra = Familia	Valores Medios de Frecuencias relativas en AE	
		% Mentona	% Pulegona
3 = B	1= Flia 12	46,38	45,24
2 = R	2= Flia 16	78,77	9,62
4=MB	3= Flia 5	14,72	29,78
1 = M	4= Flia 17	16,27	73,59

La muestra 1 pertenece a la Familia 12, presentando en su aceite esencial porcentajes de mentona y pulegona muy cercanos (46,38% y 45,24% respectivamente), conformando estos dos compuestos más del 90% del AE y recibiendo la valoración dentro de la categoría Bueno por parte de los evaluadores.

La muestra 2 pertenece a la Familia 16, presentando en su aceite esencial un mayor porcentaje de mentona en relación a pulegona (78,77% y 9,62% respectivamente), conformando estos dos compuestos más del 85% del AE y recibiendo la valoración dentro de la categoría Regular por parte de los evaluadores.

La muestra 3 pertenece a la Familia 5, identificándose en su aceite esencial una mayor participación de otros compuestos, presentando menores porcentajes de mentona y pulegona (14,72% y 29,78% respectivamente), conformando estos dos compuestos el 45% del AE. En este caso, esta fue la muestra de mayor aceptación, recibiendo la valoración dentro de la categoría Muy Bueno por parte de los evaluadores.

Finalmente, la muestra 4 pertenece a la Familia 17, mostrando su aceite esencial un 73,59% de pulegona y 16,27% de mentona; siendo la muestra rechazada por los evaluadores, recibiendo la valoración dentro de la categoría Malo.

CONCLUSIONES

El análisis sensorial se transformó, en este caso, en una herramienta de suma utilidad, dado que permitió encontrar atributos de valor importantes para los consumidores, que sería muy difícil de medir de otra manera.

Todas las propiedades organolépticas evaluadas contribuyen a la calidad del producto analizado y a partir de ellas fue posible determinar la definición de aceptación o rechazo de cada muestra para los consumidores.

Las muestra 1 y 3 fueron las de mayor aceptación para los tres atributos evaluados, presentando mayores valores de aceptación en sus aceites esenciales y el aroma de sus hojas.

La muestra 4 no tuvo aceptación en su aceite esencial y en el aroma de las hojas, presentando en estos dos atributos los menores valores de aceptación evaluados. La muestra 2, en cambio, presentó para los atributos mejor aceptación, pero mostrando valores intermedios entre las cuatro muestras, bajo las categorías de regular a bueno.

Solo para el color de hojas el grado de aprobación fue similar en las cuatro muestras en la categoría de bueno.

Al analizar la composición de los aceites esenciales de las muestras evaluadas, se concluye que es importante la relación entre los dos compuestos principales del aceite esencial de la peperina en la preferencia para el consumidor tradicional. A proporciones semejantes de los compuestos mayoritarios, mentona y pulegona, pero en presencia de mayor diversidad de compuestos, es el perfil de mayor aceptación. En cambio, a mayor proporción del compuesto pulegona, en desmedro del compuesto mentona, es el perfil rechazado por los evaluadores. Sin embargo, una alta proporción de mentona (tomando un aroma más semejante a la menta), fue aceptada pero considerada en la categoría regular.

Con respecto a los comentarios de los participantes de la evaluación sensorial, se planteó que era una experiencia diferente, agradable e interesante.

BIBLIOGRAFÍA

- Batallán, G, Tonn, C.; Ludueña Almeida, F.; Flores, F. S.; Torre, R. A.; Douthat, C. B.; Contigiani, M. S. y Almiron, W. R. 2008. Actividad larvicida de extractos de *Minthostachys mollis* (lamiaceae) sobre *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae). En: III Congreso Latinoamericano de Zoonosis. Libro de Resúmenes. Buenos Aires, Argentina, 216 pp.
- Cano Perez, C. A. 2007. Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña”. Publicado en internet, Disponible en <http://www.cybertesis.edu.pe.html>. Activo junio 2016.
- Cariddi, L.; Moser, M.; Andrada, M.; Demo, M.; Zygadlo, J.; Sabini, L. y Maldonado, A. 2009. The effect of *Minthostachys verticillata* essential oil on the immune response of patients allergic to dust mites. *Molecular Medicinal Chemistry*. 20: 24 – 28
- Dadé, M.M.; Fioravanti, G.R.; Schinella, G. y Tournier, H.A. 2009. Total antioxidant capacity and polyphenol content of 21 aqueous extracts obtained from native plants of Traslasierra valley (Argentina). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8 (6): 529-539.
- Espinosa Manfugás, J. 2007. Evaluación sensorial de los alimentos. Editorial Universitaria. Universidad de La Habana, Cuba, 186 pp.
- Gallez, L. 2006. Los colores, aromas y texturas de nuestras mieles. *Agro UNS*, 3 (6): 10-15.
- Gambaro, A. y Giménez, A. 2001. Sensory and Instrumental evaluation of strawberry yogurt color. *Journal of Sensory Studies*, 16:11-22.
- Gillij, Y.; Gleiser, R. and Zygadlo, J. 2008. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresour Technology*, 99: 2507–2515.
- Gleiser, R. M.; Bonino, M. A. y Zygadlo, J. A. 2007. Bioactividad de aceites esenciales de *Minthostachys mollis* contra mosquitos [Essential oils from *Minthostachys mollis* as insecticida]. *Boletín Latinoamericano y Caribe Plantas Medicinales y Aromaticas*, 6 (6): 350-351.
- González, M. J. and Marioli, J. M. 2010. Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic 3 plants against *Paenibacillus larvae*, the

- causative agent of American Foulbrood. *Journal of Invertebrate Pathology*, 4: 23-28.
- Guyot Declerck, C. 2003. Análisis sensorial de mieles. Un léxico de olores y aromas para mieles: primeros pasos. Unité de Brasserie et des Industries Alimentaires. Université Catholique de Louvain. Belgique.
- Larrauri J. y Saura, F. 2000. Evaluation of CIE-lab colour parameters during of clarification of a sugar syrup from Mesquite pods (*Prosopis pallida* L.). *International Journal of Food Science and Techonology*, 35:385-389.
- Maldonado, A.N.; Cariddi, L.; Alaniz, F.; Zygadlo, J.; Grosso, M. y Sabini, L. 2007. Inhibición in vitro de la desgranulación de basófilos por drogas utilizadas habitualmente en el tratamiento del asma. Comparación con productos vegetales inmunomoduladores. *Archivos de Alergia e Inmunología Clínica* 38: 58-72.
- Manresa A. y Vicente, I. 2007. El color en la industria de los alimentos. Editorial Universitaria. La Habana, Cuba, 65 pp.
- Martin, G. 1995. Etnobotánica. Manual de Conservación de la serie Pueblos y Plantas. Ed. Nordan Comunidad. Montevideo. (Reimpresión). 240pp.
- Montenegro, G.; Gómez, M.; Pizarro, R.; Casaubon, G. y Peña, R. 2008. Implementación de un panel sensorial para mieles chilenas. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35 (1): 51-58.
- Mora, F.; Araque, M.; Rojas, L.; Ramirez, R.; Silva, B. and Usubillaga, A. 2009. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb Vaught from the Venezuelan Andes. *Natural Products Communications*, 4 (7): 997-1000.
- Palacios, S.; Bertoni, A.; Rossi, Y.; Santander, I. and Urzúa, A. 2009. Insecticidal activity of essential oils from native medicinal plants of Central Argentina against the house fly, *Musca domestica* (L.) *Parasitology Reserch*, 106:207–212.
- Resurreccion, A. V. A. 1998. Consumer Sensory Testing for Product Development. Aspen Publisher Inc. Gaithersburg, Maryland.
- Sabini, M.; Cariddi, L.; Escobar, F.; Aguilar, J.; Tonn, C.; Contigiani, M. and Sabini, L. 2010. Action of extracts obtained with organic solvents from *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling on viability of Herpes simplex Type 1 virus (HSV-1). *Molecular Medicinal Chemistry*, 21: 84-87.

- Torricella R.; Zamora, E. y Pulido, H. 2007. Evaluación sensorial. Aplicada a la Investigación, desarrollo y control de calidad en la Industria Alimentaria. Editorial Universitaria. Universidad de La Habana, Cuba, 138 pp.
- Torricella Morales, R. G. y Huerta Espinosa, V. M. 2008. Análisis Sensorial aplicado a la restauración. Antología. Puebla: Instituto Culinario de Mexico - Editorial Universitaria, México, 69 pp.
- Villarroel L., Álvarez J. y D. Maldonado. 2003. Aplicación del Análisis de Componentes Principales en el Desarrollo de Productos. Acta Nova 2(3):399-408.
- Vogt, M.; Tonn, C.; Contigiani, M.; Sabini, L. y Rosas, S. 2007. Actividad del extracto clorofórmico de *Minthostachys verticillata* sobre especies del género *Fusarium* [Antifungal activity of chloroformic extracts of *Minthostachys verticillata* against *Fusarium* species]. Boletín Latinoamericano y del Caribe. Plantas Medicinales Aromaticas, 6 (6): 371-372.
- Vogt, M. V.; Sutil, S. B.; Escobar, F. M.; Sabini, M. C.; Cariddi, L. N.; Torres, C. V.; Zanon, S. M and Sabini, L. 2010. *Minthostachys verticillata* essential oil and its major components: antiherpetic selective action in HEP-2 cells. Molecular Medicinal Chemistry, 21, 117-120.
- Zamora, E. 2007. Evaluación Objetiva de la Calidad Sensorial de Alimentos procesados. Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia, MINAL, Cuba. Editorial Universitaria. Universidad de La Habana, Cuba, 301 pp.

CONCLUSIONES GENERALES

El proceso de mejoramiento de las plantas depende de la existencia de variabilidad genética a partir de la cual se pueda realizar selección. En este caso, poblaciones silvestres constituyeron la primera fuente de variabilidad genética junto a la selección de individuos derivados del cultivar Champaquí-FCA preexistente. Con el nuevo germoplasma obtenido se generó una población de base genética amplia de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling, que sirvió de población inicial para el proceso de selección propuesto en este trabajo.

Conjuntamente se herborizó e identificó material de cada lugar de recolección, contándose con ejemplares patrones para futuras determinaciones.

Se inició la conservación de germoplasma a largo y mediano plazo como una estrategia de preservación de la especie y fuente de genes para posteriores estudios.

Se caracterizaron fenotípicamente poblaciones silvestres de Peperina, situadas en la zona de sierras de la Provincia de Córdoba.

Se encontró que las variables evaluadas tienen un importante grado de consenso para explicar la variabilidad observada.

De manera general, los caracteres morfológicos y químicos evaluados en estas poblaciones, mostraron que aún se mantienen rangos grandes de variación en la especie, dentro de las poblaciones silvestres, a pesar del impacto de la recolección.

Las características ambientales de cada sitio de recolección y la variación intra e inter poblacional determinada, tanto en poblaciones silvestres como cultivadas, permiten inferir una posible diferenciación en ecotipos, como respuesta adaptativa de la especie.

La población de base genética amplia generada mostró variabilidad para los caracteres evaluados y permitió definir los límites en cuanto a los caracteres criterio de selección como rendimiento vegetativo, tolerancia a virus *Cucumber mosaic virus* (CMV), rendimiento de aceites esenciales y respuesta al manejo cultural.

Se seleccionaron individuos que superaban la media poblacional del cultivar Champaquí-FCA en los distintos caracteres estudiados.

La selección se orientó a los caracteres altura de planta, peso fresco, y área foliar, ya que mayores valores implican mayor rendimiento tanto en material vegetal como en aceites esenciales; y por otro lado hacia la composición de ese aceite esencial para una mejor aceptación del usuario consumidor.

En una segunda instancia de selección, se caracterizó fenotípicamente 19 familias de peperina selectas y se determinaron sus parámetros genéticos.

Se determinó la existencia de variabilidad tanto entre familias como dentro de cada una de ellas en distintas proporciones. Es de interés remarcar que los caracteres componentes de rendimiento muestran en muchos ejemplares entre las distintas familias, tanto en plantas adultas como en la etapa de plantín, valores medios superiores en relación a estos mismos caracteres en las poblaciones iniciales del cultivar Champaquí-FCA.

En la producción de plantines se verificó un gran porcentaje de germinación en condiciones de invernadero y se observó una buena respuesta en el desarrollo de las plántulas en los primeros estadios.

La multiplicación agámica presentó una gran variación entre las PM selectas, pudiéndose diferenciar algunas como poco adaptadas a este tipo de reproducción.

Se constató buena respuesta al cultivo en cuanto a producción de biomasa por planta. El peso fresco de plantas es un carácter importante para la determinación del rendimiento. En este caso quince familias mostraron un peso con un mérito genético superior a la media inicial y sólo cuatro familias se diferenciaron con valores menores (pero manteniéndose dentro del rango de variación inicial).

Se determinaron diferencias significativas entre familias para área foliar (AF) y se encontraron en todos los casos valores superiores a la media de las plantas selectas de la población inicial.

El peso seco mostró diferencias significativas entre familias, y sólo diez de ellas con un mérito genético superior a la media; presentando entre las familias un valor medio inferior al de la población inicial.

Se obtuvo una favorable respuesta en el mejoramiento del rendimiento de aceite esencial mediante la selección basada en este carácter. Todas las familias selectas se diferenciaron significativamente de la media general de la población inicial. Al respecto es de destacar la producción de aceite esencial en las familias 5, 12, 16 y 17, cuyos valores estuvieron muy por encima del promedio (1,68 %). Esta variable fue la de mayor respuesta a la selección por lo que se infiere que es factible esperar avances en nuevas poblaciones mejoradas.

El porte de las plantas no mostró capacidad discriminante entre los materiales, ya que la totalidad de plantas que finalizaron su ciclo de cultivo, presentaron en todos los ensayos el tipo de porte erecto.

En individuos de distintas familias, se observó la sintomatología correspondiente a la presencia del *Cucumber mosaic virus* (CMV), pero es de destacar que ante la presencia del CMV se observó un comportamiento diferencial entre las familias, ya que de las 19 familias evaluadas, sólo 5 (cinco) de ellas manifestó la sintomatología, pero en ninguna familia las plantas derivadas de estacas de las plantas madres manifestaron la virosis; lo cual evidencia una posible resistencia al virus.

En una tercera instancia de selección, siguiendo descriptores morfológicos, de rendimiento, de tolerancia a virus (CMV) y de rendimiento en aceites esenciales, de las 19 Familias evaluadas, se descartaron siete familias (Familias 6, 7, 8, 10, 11, 13 y 18) por presentar síntomas de virosis y/o por bajo porcentaje de supervivencia a campo. El grupo de las 12 familias restante se utilizó para la extracción de aceites esenciales y su posterior caracterización.

En las 12 Familias evaluadas, se identificaron distintos perfiles químicos en el aceite esencial. Al analizar la composición de los aceites esenciales de las muestras evaluadas, se concluye que es importante la relación entre los dos compuestos principales del aceite esencial de la peperina en la preferencia para el consumidor tradicional. A proporciones semejantes de los compuestos mayoritarios, mentona y pulegona, pero en presencia de mayor diversidad de compuestos; es el perfil de mayor aceptación. En cambio, a mayor proporción del compuesto pulegona, en desmedro del compuesto mentona, es el perfil rechazado por los evaluadores. Sin embargo, una alta proporción de mentona (tomando un aroma más semejante a la menta), fue aceptada pero considerada en la categoría regular.

En muestras de material vegetal seco, los evaluadores califican de mayor importancia el aroma de la muestra, otorgando diferentes categorías de aceptación a las muestras, a diferencia del atributo color de hoja donde el porcentaje de grado de aceptación fue similar en todas las muestras promediando en la categoría de bueno.

En el conjunto de familias evaluadas, varias se destacan, ya sea por sus caracteres componentes del rendimiento, como así también en la composición de sus aceites esenciales, mostrando perfiles químicos de interés, ya sea de acuerdo a la evaluación sensorial realizada, como así también de acuerdo a la bibliografía que presenta a la especie con bioactividad .

El proceso final de selección se llevó a cabo sobre las familias selectas, tomando como criterio de selección el resultado de la evaluación sensorial (aceptación o rechazo), seleccionando entre los individuos que se destacaron por presentar valores superiores en los caracteres morfológicos, resistencia al virus y rendimiento de aceites esenciales, formando a partir de ellos las poblaciones mejoradas.

A partir de los caracteres cuantitativos y cualitativos evaluados fue posible establecer las diferencias entre las 12 Familias selectas. Siendo el porcentaje de los componentes mayoritarios, mentona y pulegona, en el aceite esencial, una de las variables cuantitativas de mayor valor discriminante. En función de éstas variables, a nivel químico, las 12 Familias se diferenciaron en 4 grupos:

- Familias 1, 5, 15 y 19: perfil con proporciones semejantes de los compuestos mayoritarios, mentona y pulegona, pero en presencia de mayor diversidad de compuestos, no superando juntos el 50% del AE.
- Familias 2, 4, 12 y 14: perfil con proporciones semejantes de los compuestos mayoritarios, mentona y pulegona, superando juntos el 80% dentro del AE.
- Familias 3, 9 y 16: perfil con mayor proporción de mentona.
- Familia 17: perfil con mayor proporción de pulegona.

La diferenciación morfológica y química entre las distintas familias selectas posibilita diferentes rumbos o destinos en la producción.

De acuerdo al objetivo general propuesto, se pudo obtener por selección, poblaciones mejoradas de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling “peperina” en los caracteres componente del rendimiento, tolerancia al virus (CMV) y rendimiento y calidad de aceite esencial. Además, se corroboró la hipótesis planteada al observarse en la progenie caracteres morfológicos y químicos diferenciales.

A partir de estas poblaciones obtenidas, se espera favorecer el cultivo de la especie y satisfacer las necesidades de los productores, la industria y la comercialización de la peperina.

Consideraciones particulares relacionadas con el ámbito de las Ciencias Agropecuarias

El mercado argentino de plantas medicinales, involucra una cantidad de proveedores que mayormente basan su comercio en la actividad extractiva a partir de ambientes naturales, mientras que el aprovisionamiento a través del cultivo representa una fracción menor del mismo. Esto plantea serios problemas: en primer lugar, constituye un obstáculo para la estandarización del material comercializable, ya que las fuentes de variabilidad para una misma especie son diversas; en segundo lugar, representa una marcada presión sobre los ecosistemas naturales, llegando a generar

notorios casos de completa eliminación de poblaciones silvestres. Por lo tanto se vuelve necesario poner en cultivo a las especies amenazadas y el mejoramiento genético que se pueda realizar en estas especies, lleva a lograr productos de calidad y productividad, que permiten una mejor inserción en el mercado. Además, por ser cultivos alternativos a desarrollarse en pequeñas superficies, es posible asegurar el desarrollo de regiones tradicionalmente postergadas que poseen escasos recursos genuinos para generar ingresos.

Teniendo en cuenta la demanda y la presión de extracción que tiene la peperina silvestre, fundamentalmente en la provincia de Córdoba, se destacan las ventajas del cultivo de una peperina mejorada y caracterizada, respecto a la recolección silvestre; ya que un cultivo orientado, conociendo el material de partida, dará mejor respuesta a los requerimientos industriales de calidad y estabilidad en cuanto a su rendimiento y composición química. El cultivo de este modo garantiza calidad en el producto final, además de no atentar contra las poblaciones naturales.

Este proyecto de investigación, permitió avanzar en el mejoramiento de la especie sin perder los caracteres de interés agronómicos fundamentalmente obtenidos en los trabajos precedentes. El aporte de esta tesis radica en continuar el mejoramiento de la especie a partir de un cultivar obtenido, mediante la reintroducción de germoplasma silvestre en un plan de mejoramiento, buscando obtener un producto de mayor calidad organoléptica. Por otra parte, la evaluación sensorial, es una metodología novedosa en este tipo de trabajo, que permitió involucrar en la temática a las comunidades de interés, es decir personas relacionadas a la especie (recolectores, productores, consumidores) logrando así un producto más aceptado por el mercado tradicional de consumo. Además, este acercamiento, permitió lograr el interés de productores, a través de un material vegetal con las características adecuadas para el mercado.

En los últimos años, avances en el conocimiento sobre la composición química, principios activos y actividad farmacológica de plantas aromáticas y medicinales, han despertado un gran interés por estas especies. Específicamente en peperina, existen numerosos estudios que muestran la importancia de la especie como recurso interesante por sus propiedades biocidas e inmunológicas; por ello es importante el material en estudio ya que muestra características químicas promisorias en este sentido.

Finalizada esta instancia del trabajo de investigación, se realizaron evaluaciones de los distintos materiales obtenidos, analizando pautas para labores culturales, como así también datos de rendimiento de parcelas de cultivo que pueden servir de información preliminar para realizar a posterior, análisis de rentabilidad y costos para la explotación de la especie según diferentes fines o interés por parte de los productores.

Es importante el rol que cumple la Facultad de Ciencias Agropecuarias con este tipo de trabajos, que dará respuesta a las necesidades de poner en cultivo la especie con un material de características destacadas. Por lo cual este trabajo, además de ampliar el conocimiento sobre el cultivo de la peperina y analizar parámetros productivos obteniendo poblaciones superiores, permite la posibilidad de satisfacer las necesidades de los productores, la industria y la comercialización de la peperina.

Futuras líneas de investigación

1. Continuar seleccionando materiales superiores en función de la calidad de sus aceites esenciales y de su comportamiento agronómico para dar continuidad al mejoramiento genético del cultivo orientado a diferentes destinos de producción según las características de interés.
2. Evaluar la capacidad antioxidante de los aceites esenciales de los materiales obtenidos.
3. Evaluar la diversidad genética en clones de las diferentes líneas de peperina evaluadas, mediante electroforesis de isoenzimas y marcadores moleculares.
4. Evaluar en pruebas *in vitro* la capacidad antimicrobiana, antiviral y/o efecto insecticida de extractos y aceites esenciales de las distintas líneas de peperina obtenidas.
5. Llevar a cabo ensayos comparativos de rendimiento con el fin de continuar con la selección de los materiales superiores según calidad, producción y características de AE en función de la interacción con el ambiente.

6. Llevar a cabo la inscripción de cultivares y/o variedades de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling “peperina” en el Instituto Nacional de Semillas (INASE).

ANEXO 1

Encuesta Evaluación Sensorial

ENCUESTA ORGANOLÉPTICA de PEPERINA

NOMBRE: _____

EDAD: _____

OCUPACIÓN: _____

1- CONOCE LA PLANTA DE PEPERINA? SI.....NO.....Sólo en Ramillete.....

2- ¿LA HA PROBADO O USADO ALGUNA VEZ? SI.....NO.....

¿EN QUÉ FORMA?: Infusión....., Mate....., Condimento.....

- En los siguientes cuadros ubique cada muestra en la categoría que considere, utilizando una X. CATEGORIAS: MB=Muy Buena, B=Buena, R= Regular, M=Mala

3- EN CUANTO AL COLOR DE LAS HOJAS:

Muestra	MB	B	R	M
1				
2				
3				
4				

Muestra	MB	B	R	M
5				
6				
7				
8				

Muestra	MB	B	R	M
9				
10				
11				
12				

4- EN CUANTO AL AROMA DE LAS HOJAS:

Muestra	MB	B	R	M
1				
2				
3				
4				

Muestra	MB	B	R	M
5				
6				
7				
8				

Muestra	MB	B	R	M
9				
10				
11				
12				

5- EN CUANTO A LAS MUESTRAS DE ACEITE ESENCIAL (AE):

Muestra	MB	B	R	M
1				
2				
3				
4				

Muestra	MB	B	R	M
5				
6				
7				
8				

Muestra	MB	B	R	M
9				
10				
11				
12				

6-- ¿PODRÍA ASOCIAR ALGUNA DE LAS MUESTRAS DE ACEITE CON MUESTRAS DE HOJAS? ¿CUÁLES?

ACEITE N°.....con MUESTRA N°.....

ACEITE N°.....con MUESTRA N°.....

ACEITE N°.....con MUESTRA N°.....

7- ¿QUÉ LE PARECE MAS IMPORTANTE, EL COLOR O EL AROMA DE LA MUESTRA?

COLOR..... AROMA.....

8- ¿Algún comentario?.....

Muchas Gracias por su participación.

FE DE ERRATAS

RESUMEN. Donde dice: “Para algunos de los caracteres se estimaron valores de heredabilidad en sentido amplio entre un 25 y un 44%, encontrándose además en varios de los caracteres evaluados, valores superiores a la media de las plantas selectas de la población inicial”

Debe decir: “Para algunos de los caracteres se estimaron valores de heredabilidad en sentido amplio entre 43 y 76%, encontrándose además en varios de los caracteres evaluados, valores superiores a la media de las plantas selectas de la población inicial.”

ABSTRACT. Donde dice: “For some of these traits, values of broad-sense heritability were ranged between 24 and 44%, and values higher than the average of selected plants of the initial population were found in several of the characters evaluated.”

Debe decir: “For some of these traits, values of broad-sense heritability were ranged between 43 and 76%, and values higher than the average of selected plants of the initial population were found in several of the characters evaluated.”

Pág. 89. Donde dice: “La heredabilidad en sentido amplio varió entre 0,19 y 0,43”; **Debe decir:** “La heredabilidad en sentido amplio varió entre 0,43 y 0,76”.

Pág. 90. Donde dice:

Tabla 3.3: Heredabilidad de los caracteres productivos y varianzas que lo determinan: Varianzas genética, ambiental y Heredabilidad en sentido amplio.

Variable	Varianza Genética	Varianza Ambiental	Heredabilidad sentido amplio
PS	611,99	2478,09	0,19
Altura	217,63	282,26	0,44
Nº R	142,47	409,53	0,26
PF	5171,66	7655,70	0,40

Peso Seco (PS), Longitud de rama más larga (Altura), Número de ramas (Nº R) y Peso fresco (PF).

Debe decir:

Tabla 3.3: Heredabilidad de los caracteres productivos y varianzas que lo determinan: Varianzas genética, ambiental y Heredabilidad en sentido amplio.

Variable	Varianza Genética	Varianza Ambiental	Heredabilidad sentido amplio
PS	6425,72	2478,09	0,72
Alt.	232,58	282,26	0,45
Nº R	217,63	282,26	0,43
PF	541,09	208,03	0,72
Rto. AE	2,2486	0,7098	0,76

Peso Seco (PS), Longitud de rama más larga (Alt.), Número de ramas (Nº R), Peso fresco (PF) y Rendimiento Aceite Esencial (Rto. AE).