



Evaluación de clones de *Achyrocline satureioides* en distintas
situaciones de interacción intraespecífica
Oviedo Ana Laura, 2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Departamento de ciencias naturales

Trabajo Final (Cód. 2147)

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Tema

Evaluación de clones de *Achyrocline satureioides* en distintas situaciones de interacción intraespecífica

Estudiante: Ana Laura Oviedo (DNI 36.187.016)

Directora: Dra. Susana Amalia Suárez (DNI 16.529.951)

Co-Directora: Dra. Antonia J. Oggero (DNI 14.574.966)

Agradecimientos

A todos los que transitaron este largo camino junto a mí; a mi Tía Porota por su amor y la gran oportunidad que me brindó, a mis padres Pepe y Marce por el esfuerzo que hicimos juntos, gracias por cada abrazo y palabra de aliento, y por cada logro que celebramos juntos, a mi hermano José por su incondicionalidad y amor especial, a mi compañero de sueños, ruta y vida Gonzalo y a toda su familia, también la mía, Ale, Cande, Agus, Cristian, Mariana y los abuelos que me compartieron Ana y Roberto, al hermano que elegí Leo, por tanta compañía, alegría, apoyo mutuo y tantos cumpleaños juntos y por último mi cariñoso agradecimiento a la familia que armé durante estos años, mis queridos amigos Agustín, Melina, Melisa, Sheila y Daiana. También gracias a los maestros que aportaron en mi formación especialmente a Susana Suárez por tu entrega y dedicación, gracias. Por siempre, gracias.

Resumen

La reproducción asexual artificial por cultivo de tejidos (micropropagación), posibilita la conservación de especies de plantas y facilita la propagación de aquellas seleccionadas y mejoradas para cultivo, generando clones idénticos al progenitor. Es así que la posibilidad de obtener individuos genéticamente homogéneos, nos genera preguntas ¿cuál será la variabilidad de las características vegetativas y reproductivas en el conjunto de los individuos o clones? La interacción entre esos individuos ¿modificará la expresión de dicha variabilidad? Y la formulación de una hipótesis: en plantas de *Achyrocline satureioides*, producidas por micropropagación, se expresará variabilidad en características vegetativas y reproductivas, ya que la interacción entre clones influirá sobre la expresión de esa variabilidad. Nuestros objetivos fueron analizar en clones de *A. satureioides*, “marcela”, producidos por micropropagación, características biológicas (vegetativas y reproductivas) y evaluarlas en tres situaciones de interacción intraespecífica. La especie en estudio es una planta nativa cuyas inflorescencias tienen valor aromático y medicinal. Diseñamos un experimento factorial, donde el factor fue densidad con tres niveles: baja, media y alta, simulando tres situaciones de interacción intra específica. En el Camus de la UNRC se trasplantaron 24 clones de *A. satureioides* distribuidos en 4 hileras. Se evaluaron características del ciclo vegetativo, reproductivo y post reproductivo del conjunto de los clones y en relación con la densidad. Se realizaron análisis univariados y multivariado. La prueba de t de Student mostró diferencias significativas ($p < 0,0001$) para todas las variables (altura, diámetro de la mata entre y dentro de hilera y biomasa de tallo y hojas y biomasa de inflorescencias) indicando la expresión de variabilidad entre los clones tanto en la etapa vegetativa como reproductiva. Al relacionar la información biológica de los clones y las variables densidad y orientación de las hileras, los tres primeros ejes del análisis de correspondencia canónica explicaron 18,5 % de la variabilidad total. El diámetro de la mata entre hileras y la biomasa de inflorescencia de los clones en alta densidad fue significativamente ($p < 0,05$) menor que la de los clones en densidad media y baja. Estos resultados permiten aceptar la hipótesis planteada, y concluir que en clones de *Achyrocline satureioides*, se expresa variabilidad tanto en características vegetativas como reproductivas, y que la interacción entre ellos en distintas densidades explica parte de esa variación.

Índice de contenidos

Introducción	2
Hipótesis	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos.....	6
Materiales y Métodos	6
Diseño experimental.....	6
Especie en estudio	8
Características del sitio experimental	8
Análisis de los datos.....	10
Resultados	11
Características del ciclo vegetativo	11
Características del ciclo reproductivo	13
Características del ciclo pos reproductivo.....	14
Características biológicas e interacción intraespecífica.....	15
Discusión	20
Conclusión	22
Bibliografía	23

Introducción

Los organismos pueden reproducirse por vía sexual o asexual por medios naturales o artificiales (Manbir Kaur, 2016). La reproducción sexual o apareamiento aleatorio entre los individuos es equivalente a la unión aleatoria de sus gametos, con lo cual las frecuencias genotípicas en los cigotos son el producto de la frecuencia de los tipos gaméticos en cada sexo que se unen al azar para producirlos, conocido corolario de la ley de equilibrio de Hardy-Weinberg (Falconer, 1990). Ello posibilita la existencia de variación genética en la población, originada no solamente a partir de la recombinación genética sino también por mutaciones aleatorias (Futuyma, 1986). Este tipo de reproducción otorga beneficios en el corto plazo debido a la variabilidad de respuesta ante cambios ambientales temporales o espaciales, y en el largo plazo por disipar la acumulación de mutaciones desventajosas así como de genes deletéreos (Crawley, 1997).

La reproducción vegetativa, un tipo de reproducción asexual, representa la producción de descendientes desde tallos, hojas o callos de un único progenitor (Smith y Smith, 2007; Manbir Kaur, 2016). Ello posibilita la creación de organismos homogéneos, clones de los progenitores (Manbir Kaur, 2016). El costo metabólico es menor que en la reproducción sexual, y en el corto plazo otorga un mejor ajuste en ambientes con una menor tasa de cambio como son los agrícolas (Manbir Kaur, 2016). La homogeneidad de los descendientes hace que se adapten fácilmente al ambiente local y como todos poseen las mismas capacidades para reproducirse puede incrementarse el tamaño poblacional fácilmente (Smith y Smith, 2007). En tanto que, a largo plazo los clones pueden perder vigor (Crawley, 1997; Manbir Kaur, 2016) ya que la baja variabilidad hará que los individuos respondan uniformemente a cualquier cambio de las condiciones ambientales (Smith y Smith, 2007).

Si bien el genotipo es el principal determinante de cómo las especies aprovechan sus recursos y por lo tanto determina el crecimiento, establecimiento y reproducción, el ambiente también actúa como gran modulador (de la Fuente *et al.*, 2006). En las especies vegetales, el crecimiento suele representarse mediante una curva sigmoidea donde en principio crecen lentamente, luego aumenta la tasa de acumulación diaria y posteriormente la tasa decrece hasta hacerse cero, donde alcanza la máxima acumulación de biomasa (Begon, 2000; de la Fuente *et al.*, 2006). El crecimiento diario

depende de la disponibilidad de recursos que la planta tenga y cómo éstos son aprovechados (de la Fuente *et al.*, 2006), es decir, del metabolismo primario de cada especie particular. Un metabolismo secundario significativo en las especies vegetales puede fundamentarse mediante la hipótesis que relaciona la disponibilidad de recursos con la producción de metabolitos secundarios según el balance de carbono-nutrientes (de la Fuente *et al.*, 2006). En plantas aromáticas y especies como *Achyrocline satureioides*, ocasionalmente el momento de máxima producción de biomasa (máximo crecimiento) no coincide con el mayor contenido de aceite esencial, característica que les atribuye valor comercial, lo cual podría asociarse al metabolismo secundario. Dicha hipótesis predice un incremento en la asignación hacia la producción de metabolitos secundarios de base carbonada cuando el cultivo está sujeto a deficiencias de nutrientes como por ejemplo nitrógeno (de la Fuente *et al.*, 2006). Esto sugiere que cuando los recursos son limitantes, el carbono se asigna preferencialmente al crecimiento y las plantas acumulan otros recursos, utilizando el carbono para incrementar la síntesis de metabolitos secundarios. Se define un rango de disponibilidad de recursos (baja, moderada y alta) donde las tasas de crecimiento y el metabolismo secundario están correlacionadas positivamente dentro del rango de baja a moderada disponibilidad, mientras que en el rango de moderada a alta disponibilidad de recursos la correlación es inversa (de la Fuente *et al.*, 2006).

Cuando los organismos crecen se producen efectos y respuestas que generan interacciones positivas, negativas o neutras entre ellos (Begon, 2000; Radosevich *et al.*, 2007). La valoración de positivas o negativas se refiere al beneficio que obtienen o no de la misma (Begon, 2000). Para el caso de individuos genéticamente homogéneos, es importante destacar que tanto los efectos como las respuestas de la interacción intraespecífica dependen de la densidad (Radosevich *et al.*, 2007; Smith y Smith, 2007). Lo cual demanda entender los efectos de la densidad demográfica sobre características vegetativas y reproductivas, crecimiento y supervivencia de los organismos, todos eventos que se determinarán por la variabilidad fenotípica del material seleccionado para la clonación.

La distribución espacial de una población, puede verse afectada por las interacciones que se dan entre los individuos co-específicos donde en un rango geográfico determinado ocuparan aquellas zonas que satisfagan sus necesidades. La posición relativa de los individuos tiene un efecto importante sobre la densidad, por ello pueden identificarse distribuciones espaciales del tipo al azar, uniforme o agrupada (Smith y

Smith, 2007). Los individuos distribuidos uniformemente están espaciados equitativamente resultado de alguna interacción de tipo negativa entre ellos, como puede ser la competencia. Como en la naturaleza el ambiente no es constante y los recursos son limitados, a medida que aumenta la densidad de una población, la demanda de recursos se incrementa (Smith y Smith, 2007). El concepto de capacidad de carga sugiere una retroalimentación negativa entre el aumento de la población y los recursos disponibles, con lo cual la regulación de la población es consecuente con la dependencia de la densidad que tenga la población (Begon, 2000). Mientras aumenta la densidad la disponibilidad de recursos per cápita disminuye y puede llegar al punto de controlar el crecimiento: población denso-dependiente (Smith y Smith, 2007). Interacciones como la competencia intraespecífica, que dependen de la densidad, al aumentar gradualmente afectan el crecimiento y desarrollo, supervivencia y reproducción de los organismos. Muchas especies vegetales muestran relación inversa entre la tasa de crecimiento y la densidad. Por ejemplo, en ocasiones el peso medio de plantas individuales disminuye con el aumento de la densidad de individuos. En casos de baja densidad todos son capaces de obtener los recursos necesarios para satisfacer demandas. A medida que se incrementa la densidad, la demanda excede el suministro de recursos per cápita que se produce a raíz de la competencia intraespecífica (Smith y Smith, 2007); la tasa de crecimiento se reduce. Frecuentemente se busca evaluar los efectos de la densidad poblacional en la biomasa vegetal. Se ha comprobado que, por ejemplo la producción de estructuras reproductivas o de diseminación se ve afectado por altas densidades poblacionales (Awan y Singh Chauhan, 2016). Otros estudios demuestran lo contrario, donde el número de plantas por unidad de área no limita el número de flores desarrolladas en plantas de maíz, donde se observa una variabilidad fenotípica natural de la especie que se intensifica cuando se magnifica el hacinamiento (Pagano *et.al*, 2007). Evaluar los efectos de la densidad es homólogo a evaluar la tolerancia al hacinamiento, para ello algunos autores toman como indicador del efecto de la interacción: una biomasa superior al 33% indica que el individuo es un competidor fuerte y la biomasa inferior al 33% puede clasificar al individuo como un competidor débil (Pagano *et al.*, 2007). Por lo tanto, los efectos de la densidad poblacional sobre el crecimiento, establecimiento y reproducción son característicos de la plasticidad genotípica (variabilidad) de cada especie.

La reproducción asexual artificial, por cultivo de tejidos (micropropagación) o enraizamiento de brotes (macropropagación), posibilita la conservación de especies de

plantas con problemas en alguna de las etapas de la reproducción sexual, en la viabilidad o en el potencial germinativo de sus semillas (Rutishauser, 1969; Manbir Kaur, 2016). También facilita la propagación de aquellas plantas seleccionadas y mejoradas para el cultivo, por sus propiedades alimenticias, medicinales, etc. (Davies, 2004; Manbir Kaur, 2016).

Es así que la posibilidad de obtener individuos genéticamente homogéneos, por micropropagación, genera nuevos desafíos y preguntas. Sabiendo que en el sentido más amplio la evolución es una alteración de las frecuencias génicas de una población; en el pool genético reflejado en el fenotipo, ¿cuál será la variabilidad de las características vegetativas y reproductivas en el conjunto de los individuos o clones? La interacción entre esos individuos ¿modificará la expresión de dicha variabilidad?

En este caso en particular se trabaja con *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C., popularmente denominada “marcela”, especie nativa de América del Sur (Giangualani, 1976; Davies 2004; Barboza *et al.*, 2006; Suárez *et al.*, 2011). Por sus propiedades aromáticas y medicinales se la recolecta de poblaciones silvestres de la sierra de Comechingones (Córdoba y San Luis) (Nuñez y Cantero, 2000; Martínez, 2011). Debido a la demanda de materia prima homogénea, por parte de la industria, es una de las especies nativas incluidas en el proyecto nacional de INTA para su domesticación y mejoramiento (Manbir Kaur, 2016; Petenatti *et al.*, 2004; Elechosa, 2009; Suárez *et al.*, 2011).

Hipótesis

En plantas de *Achyrocline satureioides*, producidas por micropropagación, se expresará variabilidad en características vegetativas y reproductivas, ya que la interacción entre clones influirá sobre la expresión de esa variabilidad.

Objetivo general

Analizar en clones de *Achyrocline satureioides*, producidas por micropropagación, características biológicas (vegetativas y reproductivas) en distintas situaciones de interacción intraespecífica.

Objetivos específicos

- a. Analizar en clones de *A. satureioides*, producidos por micropropagación, características biológicas (vegetativas y reproductivas).
- b. Evaluar características biológicas (vegetativas y reproductivas) en tres situaciones de interacción intraespecífica.

Materiales y Métodos

Diseño experimental

Un experimento con clones de *Achyrocline satureioides* se instaló el 22 de Octubre de 2015 en el Campus de la Universidad Nacional de Río Cuarto (33° 6' 35,2" S, 64° 18' 6,8" O, 420 msnm), siendo cada clon equivalente a una planta.

Dichos clones provenían de la misma planta madre cuyo origen fue una población silvestres de Cruz de Piedra (33° 19' 00'' S, 66° 37' 00'' O, San Luis, Argentina) Sierras de San Luis, incluida en la provincia biogeográfica Comechingones, (Crisci *et al.*, 2001; Arana *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2016; Arana *et al.*, 2017). Los clones se multiplicaron por micropropagación (Rosso *et al.*, 2015) y se rusticaron en la Estación Experimental de Castelar de INTA (Buenos Aires, Argentina).

El experimento presenta un diseño factorial, donde el factor fue densidad con tres niveles: baja, media y alta. En la parcela experimental se trasplantaron veinticuatro (24) clones (unidades experimentales; n= 24). Las “marcelas” se distribuyeron en 4 hileras en sentido norte-sur, distancia entre hileras 70 cm y entre clones dentro de la hilera 60 cm (3,50 m x 4,20 m) (Fig. 1).

La organización espacial otorgada a los clones generó tres (3) niveles de densidad diferentes para su establecimiento, crecimiento y reproducción, lo cual simuló 3 condiciones de interacción intraespecífica. Las densidades se organizaron como baja: “marcela” rodeada por 3 “marcelas” (n= 4), media: “marcela” rodeada por 5 “marcelas” (n= 12), y alta: “marcela” rodeada por 8 “marcelas” (n= 8) (Fig. 1).

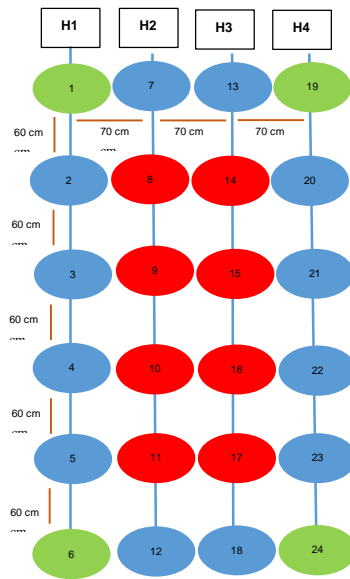


Figura 1. Distribución espacial de los clones de *A. saturoioides* en la parcela experimental (70 cm entre hileras y 60 cm dentro de la hilera). Círculo verde: densidad baja, celeste: densidad media y rojo: densidad alta.

La competencia interespecífica se evitó controlando el establecimiento de otras especies de plantas cubriendo el suelo con tela media sombra (Fig. 2) y retirándolas manualmente durante todo el experimento.



Figura 2. Vista general en el momento del trasplante de los clones en el campus de la UNRC.

Especie en estudio

Achyrocline es un género afroamericano representado en América por alrededor de 15 especies, cuya área de distribución ocupa desde los 30° de latitud Norte hasta los 41° de latitud Sur. En Argentina se encuentran siete especies del género *Achyrocline* excepto en la Patagonia (Giangualani, 1976; Crisci *et al.*, 2001).

En el caso particular de *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C., habita zonas húmedas y terrenos arenosos, en las sierras de Córdoba, San Luis y las dunas costeras de la provincia de Buenos Aires (Giangualani, 1976; Lorenzo *et al.*, 2000; Crisci *et al.*, 2001; Brun *et al.*, 2012). Es una planta perenne, con ramas de hasta 50 cm de largo. Tallos hojosos, muy ramificados desde la base. Hojas lineares, lanceoladas, cara abaxial con pubescencia lanosa muy densa. Capítulos con 4-8 flores, 1-3 hermafroditas y 3-6 femeninas. Involucro de 4-6 mm de altura, amarillo hasta amarillo rojizo, con brácteas de pubescencia lanosa densa con algunos pelos glandulares (Gattuso *et al.*, 2008; Vezza, 2015).

Existen numerosos antecedentes sobre la composición química de su fracción volátil y no volátil y su bioactividad (Desmarchelier *et al.*, 1998; Labuckas *et al.*, 1999; Ferraro *et al.*, 2008; Ouviaña *et al.*, 2007; Retta *et al.*, 2007, 2010; Carini *et al.*, 2014). Allí su amplio uso en medicina tradicional, la industria cosmética y la elaboración de bebidas sin alcohol en América del Sur (Farmacopea Brasileira, 2001; Davies, 2004; Retta *et al.*, 2012; Carini *et al.*, 2014). El valor aromático y medicinal de la especie está relacionado con la composición química tanto de la fracción volátil como de la no volátil, en particular fenólica presente en las inflorescencias (Retta *et al.*, 2012).

Caracterización del sitio experimental

La región de Río Cuarto geomorfológicamente se categoriza como planicie peri serrana distal (Gorgas y Tassile, 2006) siendo su relieve semi ondulado constituido de sedimentos eólicos franco arenosos finos. La red de drenaje es semipermanente y todas las corrientes superficiales siguen la pendiente hacia el Sudeste. El tipo de suelo corresponde a un “haplustoléntico”, con drenaje natural bueno, erosión hídrica y eólica leve (Gorgas y Tassile, 2006). Las condiciones climáticas son de tipo sub húmedo con estación seca marcada, precipitaciones de 700 a 800 mm anuales (Gorgas y Tassile, 2006).

En la parcela ubicada al este del Campus de la UNRC (Fig. 3) se tomaron 4 muestras de suelo al azar, cada muestra estuvo integrada por 10 sub-muestras de los primeros 15 cm de suelo. Las mismas se analizaron en el Laboratorio de Suelo EEA San Luis INTA. El carbono orgánico se realizó por vía húmeda por el método de Walkley y Black, modificado por Richter, estimando oxidación en 77%. El fósforo disponible o asimilable se extrajo por el método de Kurtz y Bray. El nitrógeno total se realizó por el método micro Kjeldahl. La conductividad eléctrica se midió en el extracto de la pasta de suelo. Las muestras de suelo de la parcela experimental se caracterizaron químicamente por 1,4 % de carbono, 2,4 % de materia orgánica, 1,5 mg/gr de nitrógeno y 42 mg/kg de fósforo. Además por 0,5 mS/cm conductividad media y 6,5 ph promedio. La textura del suelo de la parcela se determinó como arcillo limoso o franco limoso por el contenido de limo (47,5 %), arcilla (7,5%) y arena (45%).

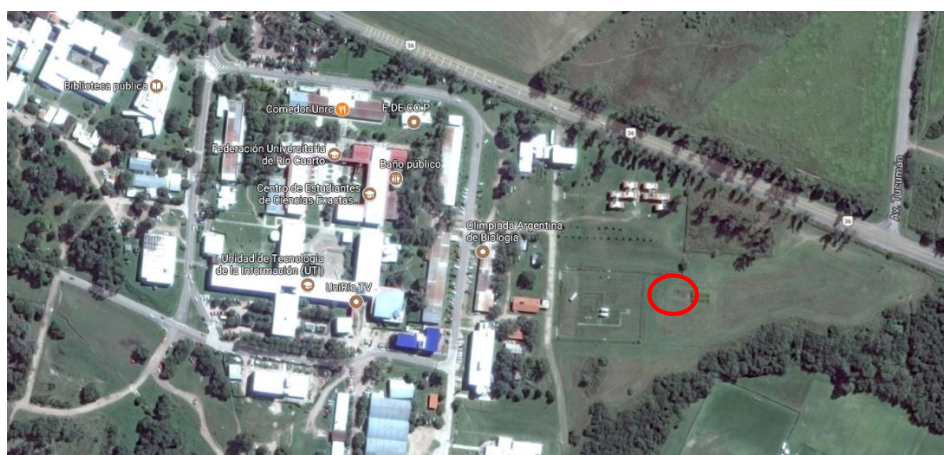


Figura 3. Localización de la parcela experimental en el campus de la UNRC.

Caracterización de variables vegetativas y reproductivas.

Durante el ciclo vegetativo (Fig. 4.a) (día del trasplante= tiempo cero) se registró regularmente, cada 3- 4 semanas: altura máxima (cm), diámetro de la mata (cm) entre y dentro de la hilera, cobertura total (%), y radiación interceptada ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) entre y dentro de la hilera (Braun-Blanquet, 1979; Begon *et al.*, 2000).

Al comienzo y durante el ciclo reproductivo (Fig. 4.b) (135 días del trasplante) también se midió cobertura de inflorescencias (%). Finalizado el periodo reproductivo, ciclo post reproductivo (170 días del trasplante), se procedió con una poda a 20 cm del suelo para cosechar las inflorescencias con la biomasa asociada (tallo y hojas) y favorecer el

rebrote, considerando que “marcela” es una planta perenne. En gabinete se registró biomasa seca (gr): total, de tallos y hojas y de inflorescencias.

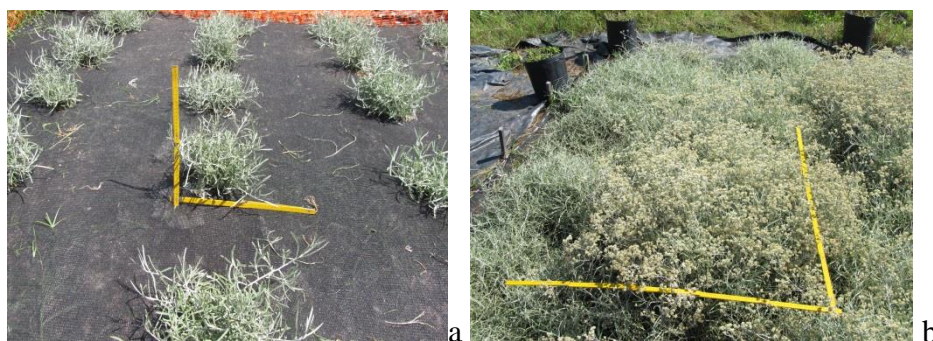


Figura 4. Clones de “marcela” en estado vegetativo (a) y reproductivo (b).

Con el uso de radiómetro (BAR.RAD DUAL USB) se midió la radiación fotosintéticamente activa (PAR: Photosynthetically active radiation) interceptada por el follaje de los clones, por encima y por debajo del canopeo. Ello permitió estimar la producción de biomasa, en función de la PAR interceptada, y la eficacia de los clones para convertir la energía lumínica en biomasa (de la Casa *et al.*, 2015). En el momento de la medición, el tallo principal de cada “marcela” se ubicó en el punto medio de la barra del radiómetro (30 cm) por encima y por debajo del canopeo. Para medir la PAR entre las hileras la barra se ubicó perpendicular a la hilera, mientras que para medir la PAR dentro de cada hilera la barra se ubicó paralela a la misma. Todas las mediciones se realizaron en condiciones de cielo despejado y durante las horas próximas al medio día solar, reduciendo lo más posible el ángulo cenital (de la Casa *et al.*, 2015).

Análisis de los datos

Para analizar las características biológicas del conjunto de los clones y las variables edáficas de la parcela, se realizaron estadísticos descriptivos: promedio y desvío estándar (Montgomery, 1991). Además se analizaron con prueba de t de Student para una media a fin de establecer la significancia de las mismas, utilizando los paquetes estadísticos Infostat (versión 2016) y Prisma (versión 2000). La radiación interceptada se consideró como la diferencia entre la PAR sobre el canopeo y la PAR debajo del canopeo. Los resultados se presentaron en tablas y se construyeron gráficos de tipo cajas y bigotes en relación con el tiempo.

Para evaluar las características biológicas en las tres densidades se utilizaron los datos del día 106 desde el trasplante, momento en que los clones diferenciaron ápices reproductivos, inicio la etapa reproductiva.

Para relacionar las variables de crecimiento de los clones conjuntamente con la densidad y distribución espacial en la parcela se utilizó el análisis de correspondencia canónica (CCA). Este permite el manejo conjunto de los datos de los clones y su distribución. La técnica de ordenación canónica detecta los patrones de variación en los datos de los clones (altura, diámetro de la copa entre y dentro de hilera, radiación interceptada entre y dentro de hilera, y cobertura de inflorescencias) que pueden ser explicados óptimamente por: densidad baja y alta, y distribución espacial Norte y Este (ter Braak, 1987; Digby y Kempton, 1987). Para el análisis se estandarizó el resultado final por centrado y normalización (PC-Ord vers. 5). Los resultados se presentaron en función del primer y segundo eje canónico (ter Braak, 1987). Para la variable densidad se realizó Test ANOVA con test a posteriori de Tuckey y Test de Bartlett para el análisis de los desvíos estándar.

Resultados

Características del ciclo vegetativo

El ciclo vegetativo fue de 110 días aproximadamente y se caracterizó por un crecimiento con apariencia curvilínea. En el momento inicial (0 día), los clones registraron una altura media de 14 cm (sd= 3 cm) (Fig. 5) En la etapa de crecimiento máximo (106 días) la altura de los clones fue de 44 cm (sd= 11 cm) (Fig. 5), el diámetro de la mata entre hileras fue de 83 cm (sd= 14 cm) (Fig. 6a) y dentro de hilera fue de 79 cm (sd= 19 cm) (Fig. 6b), mientras que la radiación interceptada dentro de la hilera fue de $1508 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (sd= $87\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Fig. 7a) y entre las hileras fue de $1397 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (sd= $112\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Fig. 7b).

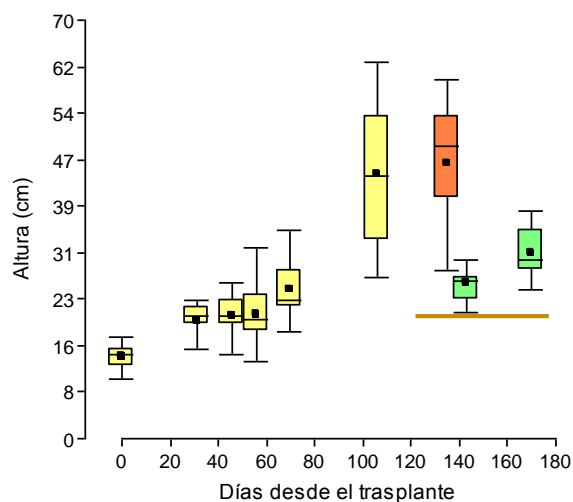


Figura 5. Altura (cm) de los clones de “marcela” en etapa vegetativa (amarillo), reproductiva (naranja) y vegetativa post cosecha (verde). Línea horizontal representa la altura de corte en la cosecha.

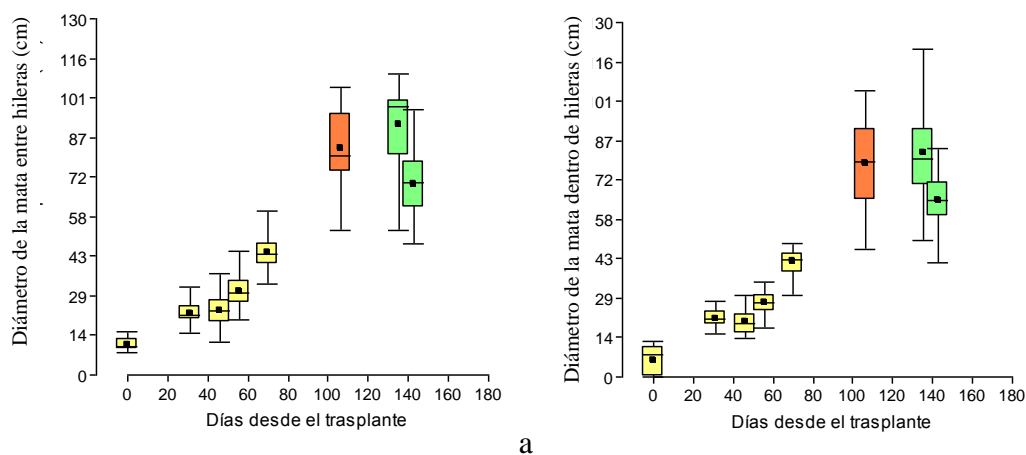


Figura. 6. Diámetro de la mata (cm) de los clones de “marcela” entre hileras (a) y dentro de la hilera (b) en la etapa vegetativa (amarillo), reproductiva (naranja) y vegetativa post cosecha (verde).

La prueba de t de Student mostró diferencias significativas ($p < 0,0001$) para todas las variables (altura, diámetro de la mata entre hileras, diámetro de la mata dentro de la hilera, radiación interceptada entre hileras, radiación interceptada dentro de la hilera) y en cada momento medido, indicando la expresión de variabilidad entre los clones (Tabla 1).

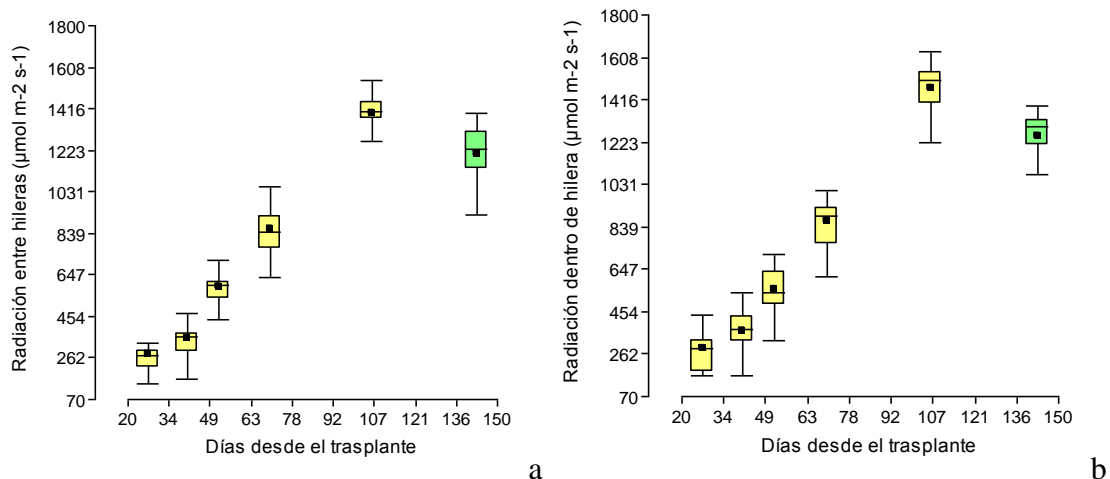


Figura 7. Radiación interceptada ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por los clones de “marcela” entre hileras (a) y dentro de la hilera (b) en la etapa vegetativa (amarillo) y vegetativa post cosecha (verde).

Tabla 1. Prueba de t de Student para cada una de las variables medidas en los 24 clones de “marcela” en momentos determinados durante la etapa vegetativa.

Día	Altura p-valor	Di.Ma.En p-valor	Di.Ma.Dn p-valor	Rad.Int.En p-valor	Rad.Int. Dn p-valor
0	<0,0001	<0,0001	<0,0001		
27				<0,0001	<0,0001
31	<0,0001	<0,0001	<0,0001		
41				<0,0001	<0,0001
46	<0,0001	<0,0001	<0,0001		
52				<0,0001	<0,0001
56	<0,0001	<0,0001	<0,0001		
70	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Características del ciclo reproductivo

En el ciclo reproductivo, los clones alcanzaron un crecimiento máximo medio (135 días) en altura de 46 cm (sd= 10 cm) (Fig. 5), diámetro de la mata entre hileras de 91 cm (sd= 15 cm) (Fig. 6.a) y dentro de hilera de 83 cm (sd= 17 cm) (Fig. 6.b). La cobertura media de inflorescencias fue 47 % (sd=34 %) siendo la cobertura total media de 94,17 % (sd=11 %). La biomasa media de tallos y hojas fue 46 gr (sd= 25 gr), mientras que la de inflorescencias fue 47 gr (sd= 39 gr) (Fig. 8).

La prueba de t de Student mostró diferencias significativas ($p < 0,0001$) para las variables (altura, diámetro de la mata entre hileras, diámetro de la mata dentro de la hilera, radiación interceptada entre hileras, radiación interceptada dentro de la hilera) y en cada momento medido, indicando la expresión de variabilidad entre los clones (Tabla 2).

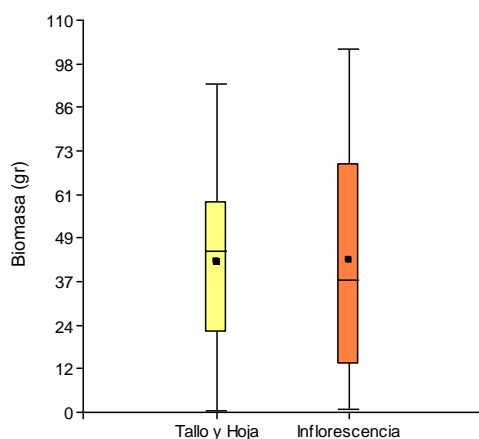


Figura 8. Biomasa cosechada de tallo y hojas (amarillo) y de inflorescencias (naranja) en clones de “marcela”.

Tabla 2. Prueba de t de Student para cada una de las variables medidas en los 24 clones de “marcela” en el momento de diferenciación de ápices reproductivos; etapa reproductiva.

Día	Altura p-valor	Di.Ma.En p-valor	Di.Ma.Dn p- valor	Biom. T y H p- valor	Biom. I p- valor
106	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Características del ciclo post reproductivo

Posterior a la cosecha (día 135) se hizo seguimiento de los clones durante los siguientes 35 días. A los 170 días se registró altura máxima de 31 cm (sd= 4 cm) (Fig. 5), un diámetro de la mata entre hileras de 70 cm promedio (sd= 11 cm) (Fig. 6a) y un diámetro de la mata dentro de la hilera de 61 cm en promedio (sd= 11 cm) (Fig. 6b). El crecimiento registrado durante estos 35 días se corresponde con el rebrote de las “marcelas” y representa la etapa post reproductiva. Al día 143 se observó una radiación

interceptada entre hileras de $1164 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 8a) y dentro de las hileras de $1193 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 8b).

La prueba de t de Student mostró diferencias significativas ($p < 0,0001$) para todas las variables (altura, diámetro de la mata entre hileras, diámetro de la mata dentro de la hilera, radiación interceptada entre hileras, radiación interceptada dentro de la hilera) y en cada momento medido, indicando la expresión de variabilidad entre los clones (Tabla 3).

Tabla 3. Prueba de t de Student para cada una de las variables medidas en los 24 clones de “marcela” en momentos determinados durante la etapa pos reproductiva.

Día	Altura p- valor	Di.Ma.En p- valor	Di.Ma.Dn p- valor	Rad.Int.En p- valor	Rad.Int. Dn p- valor
135	<0,0001	<0,0001	<0,0001		
143	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
170	<0,0001	<0,0001	<0,0001		

Características biológicas e interacción intra específica

Al relacionar las variables de crecimiento de los clones con las variables densidad y orientación de las hileras en la parcela, encontramos que el porcentaje acumulado de variación explicada por los tres primeros ejes del análisis de correspondencia canónica fue 18,5%. El primer eje explicó el 17,1 % y se correlacionó con la variable orientación Norte (Tabla 1 y Fig. 9). El segundo explicó 1,1 % y se correlacionó con la variable densidad baja (Tabla 1. y Fig. 9). El tercer eje explicó 0,3 % y se correlacionó con la orientación Este (Tabla 4).

Tabla 4. Coeficiente de correlación dentro del grupo de las variables de densidad (baja, alta) y orientación (Norte-Sur y Este-Oeste)

Variables	Eje 1	Eje 2	Eje 3
Densidad			
Baja	0,01	-0,81	0,42
Alta	0,07	-0,19	-0,07
Orientación			
Norte – Sur	0,88	0,04	0,45
Este - Oeste	-0,06	-0,16	0,76

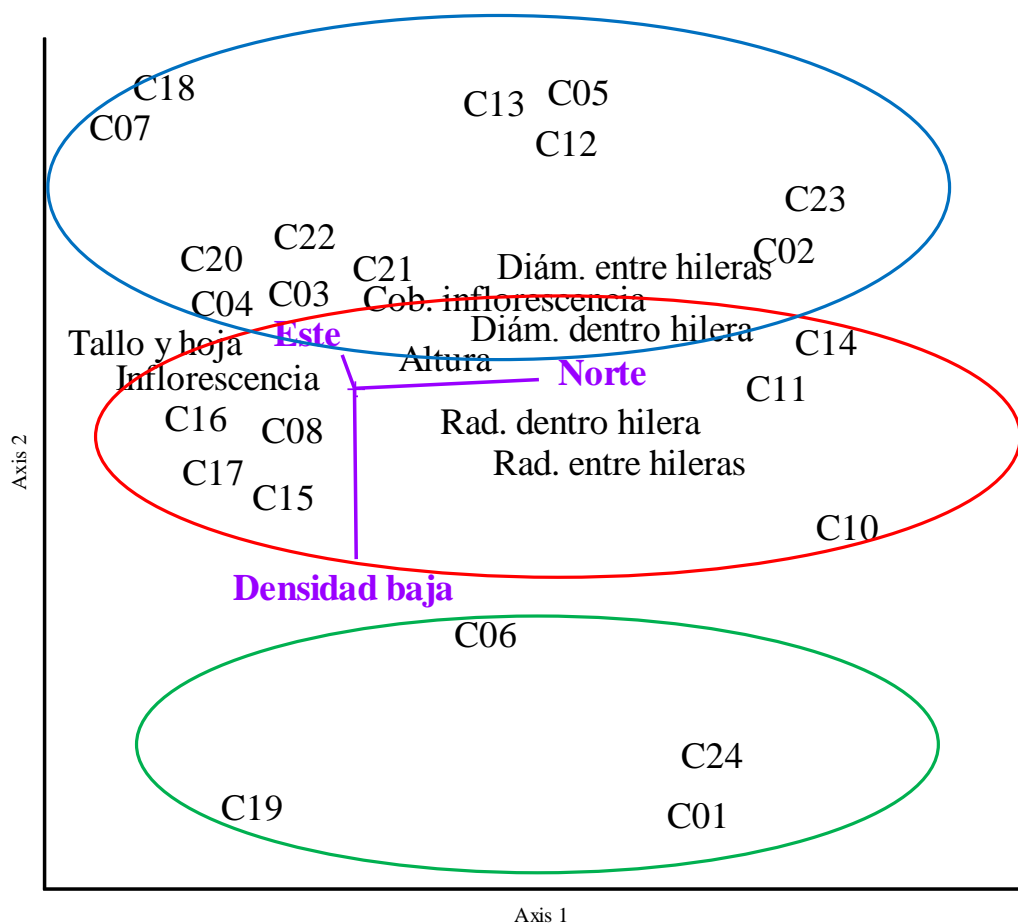


Figura 9. Análisis de correspondencia canónica (CCA) que presenta un 17,1 % de variabilidad explicada por la variable: orientación Norte (eje 1), un 1,1 % de variabilidad explicada por la variable: densidad baja (eje 2) y un 0,3% de la variabilidad explicada por la variable: orientación Este (eje 3). Dentro del óvalo verde se encuentran los clones de densidad baja, dentro del azul los de densidad media y dentro del rojo los clones de alta densidad.

Finalizando la etapa vegetativa, momento en el que se espera el mayor crecimiento (106-130 días aproximadamente) (Fig. 10) la evaluación de la altura de los clones bajo tres densidades diferentes tuvo 45 cm promedio (sd= 17 cm) para la densidad baja, 44 cm promedio (sd= 10 cm) para la densidad media y 42,5 cm promedio (sd=12 cm) para la densidad alta (Fig. 10). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas para la altura media respecto a la densidad ($p= 0,87$), mientras que presentó diferencia significativa entre los desvíos estándar ($p=0,02$).

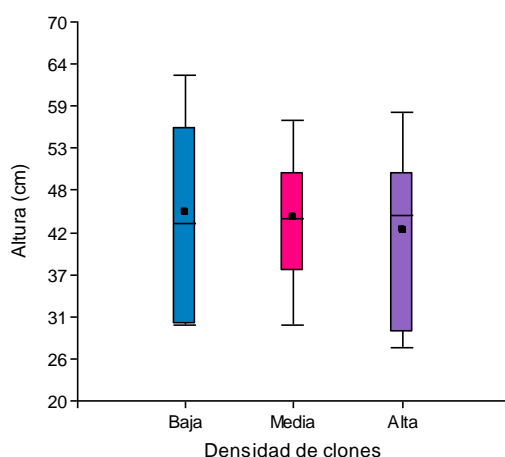


Figura 10. Altura (cm) de los clones de “marcela” bajo tres densidades diferentes: baja (azul), media (fucsia) y alta (violeta) a los 106 desde el trasplante, finalizando la etapa vegetativa.

El diámetro de la mata entre hileras presentó en la condición de densidad baja un promedio de 87 cm (sd= 14 cm), 87 cm promedio (sd= 35 cm) para la densidad media y 65 cm promedio (sd=29 cm) para la densidad alta (Fig. 11 a). El análisis estadístico mostró diferencia significativa entre las medias ($p= 0,01$) separándose significativamente los clones con densidad alta de los clones con densidad media y baja ($p < 0,05$). Así mismo el análisis de los desvíos estándar presentó diferencia significativa ($p= 0,008$).

El diámetro de la mata dentro de la hilera presento 77 cm promedio (sd= 14 cm) para la densidad baja, 81,5 cm promedio (sd=14 cm) para la densidad media y 77 cm promedio (sd= 20 cm) para la densidad alta (Fig. 11 b). No se obtuvo diferencia significativa entre las medias respecto a la densidad ($p= 0,72$) como así tampoco entre los desvíos estándar ($p= 0,38$).

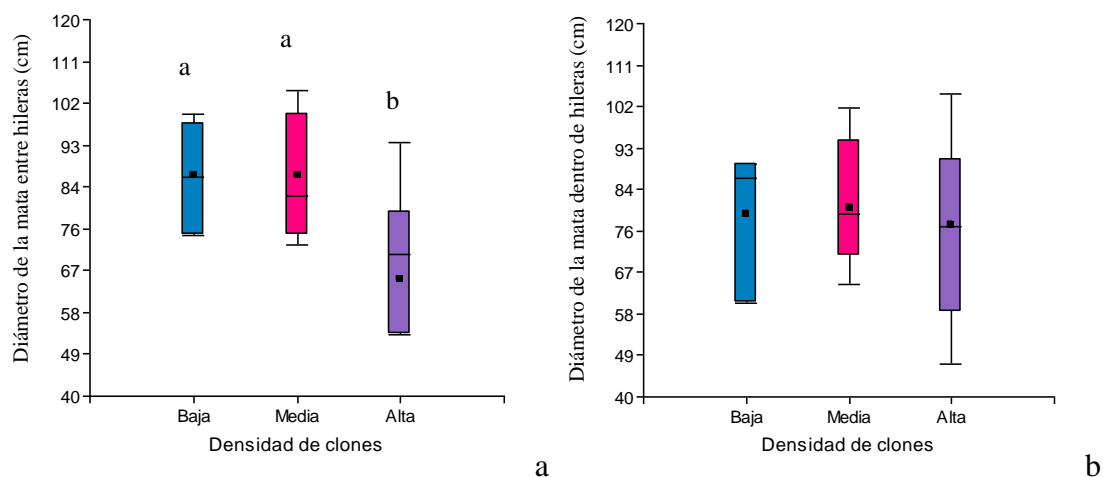


Figura 11. Diámetro de la mata entre hileras (a) y dentro la hilera (b) de los clones de “marcela” bajo tres densidades diferentes: baja, media y alta en el día 106 desde el trasplante, finalizando la etapa vegetativa. Letras distintas indican diferencia significativa ($p=0,05$) Test deTukey.

La biomasa total presentó en la densidad baja un promedio de 100 gr ($sd=108gr$), en la densidad media el promedio fue de 114 gr ($sd= 85$ gr); mientras que en la densidad alta alcanzó los 70,5 gr ($sd=65$ gr). El análisis estadístico de las medias respecto a la densidad no mostró diferencias significativas ($p= 0,8$), mientras que si presentó diferencia significativa entre los desvíos estándar ($p=0,003$).

La biomasa de tallo y hojas presentó para la densidad baja un promedio de 50 gr ($sd=53,5$ gr), de 47 gr ($sd=14$ gr) para la densidad media y de 33 gr ($sd=30$ gr) para la densidad alta (Fig. 12). El análisis de las medias respecto a la densidad no mostró diferencia significativa ($p=0,78$) mientras que los desvíos mostraron diferencia significativa ($p=0,04$) (Fig. 12). La biomasa de inflorescencias para la densidad baja presentó un promedio de 50 gr ($sd=55$ gr), de 38 gr $sd= 24$ gr para la densidad media y de 37,5 gr ($sd= 37$ gr) para la densidad alta (Fig. 12). El análisis de las medias respecto a la densidad no presentó diferencias significativas ($p= 0,74$), mientras que si presentó diferencia significativa entre los desvíos estándar ($p=0,0003$).

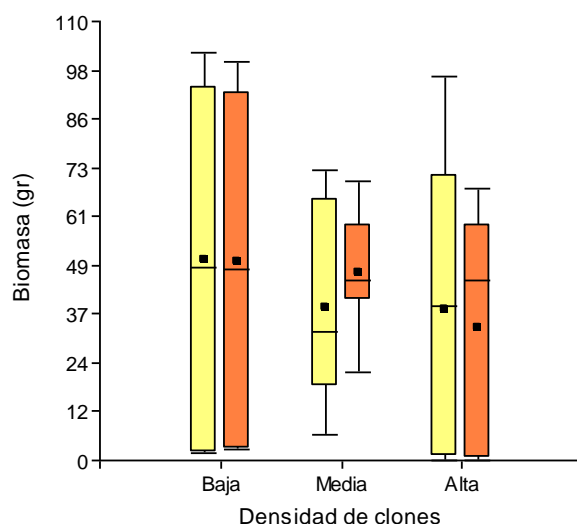


Figura 12. Biomasa total de los clones de “marcela” bajo tres densidades diferentes; baja, media y alta, representando la biomasa de tallo y hoja (gr) (amarillo) y la biomasa de inflorescencias (gr) (naranja).

Además, en los clones bajo los diferentes niveles de densidad se evaluaron la radiación interceptada tanto entre como dentro de las hileras y cobertura (Tabla 2). La máxima radiación interceptada entre hileras ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) la presentaron los clones de alta densidad y dentro de la hilera ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) los clones de baja densidad. Respecto a la cobertura de inflorescencias (%) el máximo lo alcanzaron los clones de densidad media.

Tabla 2. Evaluación de radiación interceptada entre hileras y dentro de la hilera y porcentaje de cobertura de inflorescencias para los tres niveles de organización espacial (densidad) evaluados a los 106 días desde el trasplante

Nivel de densidad	Baja	Media	Alta
Rad. entre hileras ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	1282,5 (sd: 284)	1370,8 (sd=94)	1398,6 (sd= 98)
Rad. dentro de la hilera ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	1493 (sd=80)	1465,8 (sd= 125)	1399,7 (sd=201)
Cobertura de Inflorescencias (%)	42,7 (sd= 49)	53,4 (sd= 30)	40,1 (sd= 34)

Discusión

El experimento realizado permitió poner a prueba la hipótesis de trabajo referida a que la interacción entre clones de *Achyrocline satureioides* influiría sobre la expresión de la variabilidad de características vegetativas y reproductivas, la cual es aceptada ya que la interacción intraespecífica influyó sobre dicha variabilidad.

El análisis de las características vegetativas y reproductivas en los clones de “marcela” permitió distinguir una “etapa de establecimiento de las plántulas en el sitio experimental”, con crecimiento lento (primeros 40 días). La misma fue seguida de una “etapa de crecimiento” exponencial, donde se observaron los valores más elevados de altura, diámetro de la mata entre y dentro de la hilera así como también en los niveles de radiación interceptada tanto dentro como entre hilera/s los que fueron compatibles con el máximo desarrollo de biomasa de tallo y hojas en la siguiente etapa reproductiva. Cabe señalar que la etapa de crecimiento exponencial coincide con el desarrollo vegetativo de los clones (Begon, 2000. de la Fuente *et al.*, 2006).

En la “etapa reproductiva o de floración”, aparición de los ápices reproductivos, se observó un incremento en la variabilidad de altura, diámetro de la mata entre y dentro de la hilera. En esta etapa se produce una estabilización del crecimiento (Begon, 2000. de la Fuente *et al.*, 2006), que se interrumpe por la poda de biomasa, y determina el inicio de la “etapa de rebrote” de los clones, previo al ingreso a la “etapa de reposo invernal”, ya que “marcela” es una especie que puede comportarse como anual o perenne (Giangualani, 1976; Gattuso *et al.*, 2008; Davies, 2004). La significancia de la prueba de t de Student para cada variable analizada manifiesta la existencia de variabilidad en las características vegetativas y reproductivas del conjunto de los clones de “marcelas”. Aun considerando, la homogeneidad genética lograda con la micropropagación, lo cual advierte sobre la plasticidad genotípica por parte de los clones (Manbir Kaur, 2016).

Smith y Smith (2007) proponen que el crecimiento, desarrollo y supervivencia son afectados por la disponibilidad de recursos, que son limitados por la densidad espacial de los individuos. En coincidencia con ellos, al analizar la altura de los clones de “marcela”, para cada una de las densidades, se observa cierta “ventaja” a los clones en baja densidad. La mayor variabilidad en los desvíos estándar, indicaría que hicieron un aprovechamiento diferencial de los recursos, ya que se encontraron en una zona más

“liberada” de otros clones dentro de la parcela. Por otra parte, el crecimiento en diámetro de la copa entre hileras estuvo más limitado en los clones dispuestos en alta densidad, indicando que posiblemente compitieron por la obtención y aprovechamiento de los recursos.

Los resultados observados en relación con el diámetro de la copa entre hileras respecto a los diferentes niveles de densidad indicarían que se debería utilizar para el diseño de las parcelas una mayor distancia entre las hileras en futuros experimentos (Begon, 2000; Smith y Smith, 2007). Asimismo, que no se hayan encontrado diferencias significativas en el diámetro dentro de la hilera de los clones sugiere que la distancia otorgada en la parcela fue óptima o al menos no influyó negativamente (Davies, 2004).

Por otra parte, la homogeneidad genética obtenida por la micropropagación de *A. saturoioides* le permitió establecerse, crecer y reproducirse, aunque con diferencias en las características vegetativas y reproductivas según la distribución espacial de los clones (densidad), en el corto plazo, como lo proponen Manbir Kaur (2016) y Smith y Smith (2007).

El análisis conjunto de las características de los clones y de su distribución en la parcela fue explicado mejor por la orientación de las hileras que por la densidad de plantación. Ello podría deberse a algún gradiente de humedad, dirección de los vientos o algún gradiente edáfico no controlado dentro de la parcela (Gorgas y Tassile, 2006).

En la naturaleza la distribución uniforme de los individuos como la capacidad de carga del ambiente guardan relación con el aumento de la demanda de recursos por parte de los individuos, cuya retroalimentación es negativa a medida que aumenta el número de individuos en un espacio determinado (Smith y Smith, 2007; Razquin *et al.*, 2017). El diseño experimental imitó una distribución uniforme de los clones dentro de la parcela, poniendo a prueba la demanda de recursos por su interacción intraespecífica. Como resultado de ello pudo inferirse la existencia de competencia intraespecífica en la situación de alta densidad. Esta competencia se expresó al evaluar la producción de biomasa en estado reproductivo en clones plantados en alta densidad; ya que, el hecho que todos los clones hayan alcanzado un desarrollo de estructuras vegetativas sin diferencias significativas indica que la disponibilidad de recursos estuvo limitado durante la formación de las estructuras reproductivas. Esto es compatible con lo observado en los datos de cobertura de inflorescencias donde los clones plantados en alta densidad presentaron valores inferiores respecto a los plantados en las otras dos densidades. Ello podría interpretarse (de manera homóloga) como una tolerancia al

hacinamiento entre los clones plantados en densidades baja y media versus una intolerancia al hacinamiento en los plantados en densidad alta (Pagano *et al.*, 2007).

Las preguntas disparadoras de este estudio: ¿cuál será la variabilidad de las características vegetativas y reproductivas en el conjunto de los individuos o clones? y si la interacción entre esos individuos ¿modificará la expresión de dicha variabilidad? pudieron analizarse y responderse con éxito. El efecto de la densidad determinó variaciones en las respuestas de organismos genéticamente homogéneos como resultado de sus interacciones intraespecíficas (Radosevich *et al.*, 2007; Smith y Smith, 2007).

Conclusión

Los clones de *Achyrocline satureioides* expresan variabilidad tanto en características vegetativas, altura y diámetro de la mata entre hileras, como en reproductivas, biomasa de inflorescencias. Parte de esa variabilidad es explicada por la interacción intraespecífica (competencia) entre ellos en distintas densidades.

Bibliografía

- Arana MD, Ponce M, Morrone JJ, Oggero JA. 2013. Patrones biogeográficos de los helechos de las Sierras de Córdoba (Argentina) y sus implicancias en la conservación. *Gayana Bot.* 70(2):357-376.
- Arana MD, Martínez GA, Oggero AJ, Natale ES, Morrone JJ. 2017. Map and shapefile of the biogeographic provinces of Argentina. *Zootaxa* 4341(3):420-422.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4341.3.6>
- Babushok VI, Linstrom PJ, Zenkevich IG. 2011. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 40:1-47.
- Barboza EG, Cantero JJ, Nuñez CO, Espinar LA. 2006. Flora medicinal de la provincia de Córdoba (Argentina). Pteridófitas y Antófitas silvestres o naturalizadas. Museo Botánico de Córdoba. Argentina.
- Begon M, Mortimer M, Thompson DJ. 2000. Describing populations. 1:3-27. En: Begon M, Mortimer M y Thompson DJ (Eds.). *Population ecology. A unified study of animal and plants.* Blackwell Science.
- Braun-Blanquet J. 1979. Las bases de la coexistencia vegetal. 1: 7- 15. En: Braun-Blanquet J, *Fitosociología. Bases para el estudio de las comunidades vegetales.* H. Blume Ediciones, Madrid, España.
- Brun AA, Campanella OR, Oggero AJ, Suárez SA. 2012. Cambios en el IVN y su relación con disturbios antrópicos en la vegetación serrana de Córdoba, Argentina. *Revista de Teledetección, Asoc. Española de Teledetección* 37:34-41.
- Carini JP, Klamt F, Bassani VL. 2014. Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: promising biomolecules for anticancer therapy. *RSC Adv.* 4:3131-3144.
- Crisci JV, Freire SE, Sancho G, Katinas L. 2001. Historical biogeography of the Asteraceae from Tandilia and Ventania Mountain ranges. *Caldasia* 23(1):21-41.
- Davies P. 2004. Estudios de domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas. Serie 11 FTA-INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria). Canelones, Uruguay, pp. 261. 169-200.
- Desmarchelier C, Coussio J, Ciccía G. 1998. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (“marcela”). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31(9):1165-1170.

- Elechosa MA. 2009. Manual de recolección sustentable de plantas aromáticas nativas de la región central y noroeste de la Argentina. Ediciones INTA.
- Falconer DS. 1990. Introducción a la genética cuantitativa, , CECSA, México. pp. 383.
- Farmacopea Brasileira, 2001. IV ed., Monograph: Macela.
- Ferraro G, Anesini C, Ouvina A, Retta D, Filip R, Gattuso M, Gattuso S, Hnatyszyn O, Bandoni A. 2008. Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Achyrocline satureioides* flowers from different zones in Argentina. Lat. Am. J. Pharm. 27(4):626-628.
- Futuyma DJ. 1986. Evolutionary Biology, 2º ed., Sinauer Associates, Inc Publishers. Sunderland, Massachusetts. pp. 586.
- Gattuso M, Cortadi A, Rodriguez M, Cargo J, Retta D, Bandoni A, Ferraro G, Gattuso S. 2008. Caracteres florales en la identificación de *Achyrocline satureioides*, *Achyrocline flaccida* y *Gnaphalium gaudichaudianun* (Asteraceae-Inuleae). Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromáticas 7(5):247-256.
- Giangualani RN. 1976. Las especies argentinas del género *Achyrocline* (Compositae). Darwiniana 20(3-4):549-576.
- Gorgas JA, Tassile JL. 2006. Recursos naturales de la provincia de Córdoba. Los suelos. Nivel de reconocimiento 1:500.000. Agencia Córdoba Ambiente S.E. e INTA Centro Regional Córdoba. Córdoba, Argentina, pp. 541. 39-472.
- IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Certificación) 18729. 1996. Productos aromatizantes. Aceites esenciales. Determinación del contenido de aceites volátiles.
- Labuckas DO, Maestri DM, Grosso NR, Zygodlo JA. 1999. Essential oils of *Achyroclinesatureioides*, *Achyroclinealata* and *Achyroclinetomentosa*. Planta Med. 65:184-186.
- Lorenzo D, Atti-Serafini L, Santos AC, Frizzo CD, Paroul N, Paz D, Dellacassa F, Moyna P. 2000. *Achyrocline satureioides* essential oils from Southern Brazil and Uruguay. Planta Med. 66:476-477.
- Manbir K. 2016. Different techniques of asexual reproduction in plants. IJIR 2: 2454-1362.
- Martínez GA, Arana MD, Oggero AJ, Natale ES. 2016. Biogeographical relationships and new regionalization of high-altitude grasslands and woodlands of the central Pampean Ranges (Argentina), based on vascular plants and vertebrates. Austral. Syst. Bot. 29:473-488.

- Martínez GJ. 2011. Las plantas en la medicina tradicional de las sierras de Córdoba. Ediciones del Copista.
- Montgomery DC. 1991. Diseño y análisis de experimentos. Grupo editorial Iberoamérica, Buenos Aires.
- Nuñez CO, Cantero JJ. 2000. Plantas medicinales del sur de la provincia de Córdoba. Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Ouviña A, Moscatelli V, Gattuso M, Ferraro G, Hnatyszyn O. 2007. Determinación espectrofotométrica de compuestos fenólicos en *Achyrocline satureioides* (“marcela”). Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromáticas 6(5):303-304.
- Pagano E, Cela S, Maddonni GA, Otegui ME. 2007. Intra-specific competition in maize: Ear development, flowering dynamics and kernel set of early- established plant hierarchies. 102: 198-209.
- Petenatti E, Nievas M, Del Vito L. 2004 Medicamentos herbarios en el Centro- Oeste argentino, IV. “Marcelas” y “Vira- vira” en muestras comerciales. Acta Farm. Bonaerense 23 (4): 484- 491.
- Razquin CJ, Maddonni GA, Vega CRC. 2017. Estimación no destructiva del área foliar en plantas individuales de maíz creciendo en canopeos. Agriscientia34:27-38.
- Retta DS. 2012. Parámetros fitoquímicos para la determinación de calidad de “marcela” *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteráceas). Tesis doctoral Universidad de Buenos Aires, pp. 256. 105-116.
- Retta DS, López P, Gattuso M, Gattuso S, Ferraro G, Bandoni AL. 2007. Normalización farmacopeica de marcela (*Achyrocline satureioides* (Lam. DC.): validación del método de cuantificación. Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromáticas 6(6):380-381.
- Retta DS, FernandezPenuto R, Correa M, Gattuso M, Gattuso S, Bandoni A. 2010. Diferenciación de las especies *Achyrocline satureioides*, *A. flacciday* *Gnaphalium gaudichaudianum* por sus perfiles cromatográficos. Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromáticas 9(2):93-99.
- Retta D, Dellacassa E, Villamil J, Suárez SA, Bandoni AL. 2012. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. Ind Crops Prod 38:27-38.
- Retta D, Gattuso M, Gattuso S, Di Leo Lira P, van Baren C, Bandoni A. 2009. Volatile Constituents of Five *Baccharis Species* from Northeastern Argentina. J. Braz. Chem. Soc. 20(7):1379-1384.

- Rosso C, Ianicelli J, Escandón AS. 2015. Ajuste de la micropropagación in vitro de “marcela”. II Jornadas Rioplatenses de Flora Nativa, 14 y 15 de Mayo de 2015, Ituzaingó, Bs. As,
- SENASA. 2001. Compendio Aromáticas. Guías de buenas prácticas de higiene y agrícolas. En SENASA Buenas Prácticas agrícolas y de manufactura, Buenos Aires, Argentina.
- Smith TM y Smith RL. 2007. Regulación intraespecífica de la población. 11:235-254. En:Smith T.M. y R.L. Smith (ed.) Ecología. Pearson Educación Madrid, España.
- Suárez SA, Oggero AJ, Gil A, Retta D, Bandoni A, Del Fueyo P, Brun AA, Cardoso VMI, Carpi H, Barbero I, Ritta L, Tordable M del C. 2011. Caracterización poblacional de marcela, una planta medicinal, nexa entre la investigación y la extensión. 25:1-12. XI Congreso Iberoamericano de Extensión Universitaria: integración, extensión, docencia e investigación para la inclusión y cohesión social Santa Fe, Santa Fe, Argentina. 22-25 Noviembre. E-Book, ISBN 978-987-657-711-3.
- Hussain Awan T, Sinh Chauhan B. 2016. Effect of emergence time, inter- and intra-specific competition on growth and fecundity of *Echinochloa crus-galli* in dry-seeded rice. 87: 98-107.
- Thiers B. 2016. Index Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium.
- Toledo AB. 2009. Diversidad de usos, prácticas de recolección y diferencias según género y edad en el uso de plantas medicinales en Córdoba, Argentina. Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas 8(5):389–401.
- vanBaren CM, Di Leo Lira P, Elechosa MA, Molina AM, Juárez MA, Martínez A, Perelman S, Bandoni AL. 2014. New insights into the chemical biodiversity of *Minthostachys mollis* in Argentina. Biochem. Syst Ecol. 57:374-383.
- vanTongeren OFR. 1987. Cluster analysis. En: Jongman RHG, terBraak CJF, van Tongeren OFR (Eds.): Data analysis in community and landscape ecology. 1st ed. Pudoc, Wageningen, The Netherlands. pp. 174-206.
- Verma N, Shukla S. 2015. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. J. Appl. Res. Med. Aromat Plants 2:105-113.
- Veza ME. 2015. Biología reproductiva de “marcela” (*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC). Tesis para optar el grado de Lic. en Cs. Biológicas pp. 30. Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

órdoba, Argentina.