

2021

Evaluación del grado de vulnerabilidad y estrategia de conservación *ex situ* para “Peperina de las Lomas” (*Hedeoma multiflora* Benth.)

Tesis Maestría en Ambiente y Desarrollo Sostenible - Universidad Nacional de Quilmes

Tesista: Lic. Patricia A. Peralta

Director: Dr. Hernán G. Bach

(Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria)

Co-Director: Dra. Alejandra Belizan

(Universidad Nacional de Quilmes)

**Evaluación del grado de vulnerabilidad y estrategia de
conservación *ex situ* para “Peperina de las Lomas”
(*Hedeoma multiflora* Benth.)**



Hedeoma multiflora población San Luis

Contenido

Resumen	4
Abstract	4
Descripción del contexto que da origen al proyecto	6
Objetivos del Trabajo	9
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
Marco conceptual general	10
Cambio Climático y Modelado de Nicho Ecológico	10
Conservación <i>ex situ</i>	12
Plantas Aromáticas, Biodiversidad y Sobreexplotación	13
Descripción de la especie en estudio	16
Metodología general	18
Capítulo 1: Estado de vulnerabilidad	21
Marco teórico	21
Objetivo	22
Materiales y métodos	22
Resultados	23
Discusión	24
Conclusiones	25
Capítulo 2: Evaluación frente al cambio climático	26
Marco teórico	26
Objetivo	29
Materiales y métodos	29
Resultados	32
Discusión	35
Conclusiones	38
Capítulo 3: Propuesta de acciones para su conservación <i>ex situ</i> mediante cultivo de tejidos vegetales y caracterización de las semillas.	39
Marco teórico	39
Objetivo	42
Materiales y Métodos	42
Resultados	47
Discusión	53
Conclusiones	55

Conclusiones generales	57
Perspectivas	59
Anexos	61
Anexo 1 Fotografías de la toma de datos <i>in situ</i>	61
Anexo 3 Estudio del suelo	63
Anexo 4 Fotografías del trabajo <i>in vitro</i>	64
Anexo 5 Hidrodestilación	65
Bibliografía	68

Resumen

La recolección de las plantas aromáticas y medicinales (PAM) se ha realizado por distintas comunidades desde hace mucho tiempo. En la actualidad, y como consecuencia de la gran demanda por parte de la industria, la sobreexplotación ya no es sostenible para muchas especies. Muchas de ellas, además, se enfrentan a otros riesgos de origen antrópico y tampoco pueden escapar a las modificaciones que produce el cambio climático.

Hedeoma multiflora es una especie aromática y medicinal que se encuentra en riesgo. Es importante promover su conservación y la extracción sustentable, como así también, mantener el desarrollo cultural y socioeconómico regional de sus recolectores. La protección de especies puede hacerse en su ambiente o fuera de él. En este último caso, una estrategia muy utilizada para especies en riesgo es el cultivo de tejidos *in vitro*, y su incorporación en un banco de germoplasma. Pero también es necesario determinar los motivos por los cuales se ve afectada en su supervivencia y en su distribución geográfica, para tomar medidas que apoyen programas de conservación. En conjunto, estas acciones pueden contribuir a evitar la degradación de este valioso recurso natural.

Abstract

The collection of aromatic and medicinal plants (PAM) has been carried out by different communities for a long time, but currently, due to the high demand from the industry, the overexploitation is no longer sustainable for many species. Many of them also face other risks of anthropic origin and cannot escape the modifications produced by climate change.

Hedeoma multiflora is an aromatic and medicinal species that is at risk. It is important to promote their conservation and sustainable extraction, as well as to maintain the regional cultural and socioeconomic development of their collectors.

The protection of species can be done in their environment or outside of it. In the latter case, a widely used strategy for species at risk is *in vitro* tissue culture, and its incorporation into a germplasm bank. But it is also necessary to determine the reasons why its survival and geographic distribution are affected, in order to take measures that support conservation programs. Together, these actions can help prevent the degradation of this valuable natural resource.

Descripción del contexto que da origen al proyecto

La actividad de recolección de PAM se destaca por su trayectoria histórica y socio-cultural. Las PAM se recolectan directamente de su ambiente natural y frecuentemente, se saca la planta entera. Los habitantes de las regiones de colecta en nuestro país han recolectado estas especies desde hace mucho tiempo para usos tradicionales de manera sustentable, pero en los últimos años ha aumentado la presión sobre las poblaciones naturales endémicas con áreas de distribución más restringidas. La sobreexplotación de especies silvestres aromáticas por medio de una extracción intensiva en su ambiente natural coloca a muchas de ellas en una situación de vulnerabilidad. Muchas de estas especies son endémicas como, por ejemplo, *Minthostachys mollis* o *Lippia junelliana*, con bajo número de individuos y suelen ser, en general, las más presionadas principalmente por el alto valor económico que pueden alcanzar (Elechosa et al., 2009).

La gran importancia económica que posee la explotación de recursos genéticos nativos en la actualidad, especialmente en las PAM, han generado oportunidades de iniciar procesos para su domesticación. Para evitar el extractivismo insostenible actual en la región central y norte del país, es imperativo proporcionar alternativas para su producción. La prioridad en la conservación de especies silvestres explotadas en su ambiente natural, debe ser una prioridad dentro de los programas de manejo territorial. La difusión y la sustitución progresiva del sistema de recolección extractivista por una producción controlada de la especie, es una estrategia que permitiría impulsar un perfil productivo sustentable y evitar o minimizar la degradación del biotopo, sin desestimar el tiempo de renovación de los recursos.

La conservación y multiplicación de especies vegetales nativas, con el objetivo de encontrar y explotar principios activos y otros componentes atractivos para el ser humano es una necesidad desde hace mucho tiempo. Una estrategia para su propagación y conservación es el uso de biotecnologías sencillas como el

cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, colaborando en el mantenimiento de una producción regular, en la producción de mayor biomasa y semillas para repoblar regiones vulnerables. En la actualidad ha aumentado el interés por parte de las industrias en desarrollar métodos de producción en donde la calidad, cantidad y costos no se vean influenciados por las condiciones edafoclimáticas regionales ni por regulaciones sanitarias.

Hedeoma multiflora es una especie nativa y silvestre que, además, posee gran importancia ecológica, pero se encuentra en una situación crítica debido a la sobreexplotación en su ambiente natural, debido a su intensa comercialización regional. La excesiva e inadecuada extracción fue advertida desde hace tiempo por Fester et al. (1961) y por Montes (1964). Lejos de ser superado este problema, persiste en el tiempo y su gravedad fue señalada por diferentes autores en los últimos años (Elechosa et al., 2009; Goleniowski et al., 2006; Lagrotteria & Lozada, 1993). Otros riesgos a los que también se enfrenta, son los provocados por el hombre, como la expansión de la frontera agrícola-ganadera, aumento de las urbanizaciones, incendios, emprendimientos turísticos, etc.

Actualmente, no existen planes de conservación en esta especie, y es necesario estimular su cultivo y domesticación, a fin de sostener una oferta sostenible en el tiempo sin perjudicar el ambiente. No se encontraron informes oficiales regionales sobre la oferta y la demanda de esta especie, aunque es una de las mejores pagas por su dificultad en encontrarla, su tamaño y época de recolección (Galli, 2013). Es prioritario comenzar con su domesticación y el ajuste de parámetros para su producción, como así también, generar herramientas para su conservación *in situ* y *ex situ*. Una política de estado que resguarde los recursos genéticos, permite un aprovechamiento sustentable de los mismos, permitiendo la generación de divisas y de puestos de trabajo para impulsar las economías regionales. *Hedeoma multiflora* es un buen ejemplo a tener en cuenta como referencia.

Por otro lado, también es importante determinar su distribución geográfica actual y futura para conocer su nivel de vulnerabilidad frente a procesos antrópicos y naturales como el cambio climático.

Es necesario llevar a cabo un enfoque inter y multidisciplinario en el sentido de contribuir al desarrollo socioeconómico de la región centro-norte del país a través de la evaluación de los recursos naturales vegetales existentes y la conservación del germoplasma nativo.

Objetivos del Trabajo

Objetivo general

Evaluar la respuesta de poblaciones silvestres de *Hedeoma multiflora* ante disturbios antrópicos y cambio climático, para comprender sus patrones de distribución y proponer estrategias de conservación *ex situ*.

Objetivos específicos

1. Evaluar la respuesta de poblaciones silvestres de *Hedeoma multiflora* ante disturbios antrópicos y cambio climático, para comprender sus patrones de distribución y proponer estrategias de conservación *ex situ*.
2. Ajustar un protocolo de multiplicación por cultivo de tejidos *in vitro* para su posible incorporación en un plan de conservación en un banco de germoplasma o banco *in vitro*.
3. Proponer acciones para su conservación *ex situ*.

Marco conceptual general

Cambio Climático y Modelado de Nicho Ecológico

Las condiciones climáticas del planeta han evolucionado constantemente desde su origen, según se evidencia en el registro geológico, como una gran base de datos sobre biodiversidad y el clima. El sistema climático está formado por la atmósfera, la hidrósfera, la geósfera y la biósfera. Estos forman un sistema multidimensional totalmente relacionado. Las modificaciones en este sistema no suceden aisladamente, cuando una esfera es perturbada, las otras responden. Las actividades humanas y el impacto que producen aceleran procesos que, de otra manera, son considerados variaciones naturales en el clima. Las evidencias en el cambio climático se basan en estudios del sedimento del fondo oceánico, el análisis de isótopos de oxígeno, registros en el hielo glacial, análisis dendrológicos y otros datos indirectos como los fósiles de polen y los registros de colonias de corales (Tarbuck & Lutgens, 2013). Muchas especies están bajo la amenaza de su entorno debido al cambio climático.

Dicho cambio climático y las condiciones ambientales, controlan su evolución y biología de conservación (Ai et al., 2013). Además, los cambios en el patrón climático pueden afectar la productividad de las plantas (Reddy et al., 2010), la dinámica de los ecosistemas y sus distribuciones geográficas, que cambian en respuesta a las variaciones en los regímenes de temperatura y precipitación (Lenoir & Svenning, 2015).

En muchas especies no se ha estimado el impacto de estos procesos, por lo tanto, es importante desarrollar metodologías para evaluar estos efectos y establecer estrategias de conservación en aquellas más vulnerables. Estas herramientas deben asegurar la representación de la variabilidad genética de una población, dentro de su región de distribución (Thomas et al., 2004).

Con respecto al concepto de nicho ecológico, se utiliza generalmente para describir al espacio que ocupa una especie en condiciones naturales (Begon et al., 2006), pero que puede ser abordado desde varios puntos de vista. Los conceptos más utilizados en la técnica de Modelado de Nicho Ecológico (MNE) son los propuestos por Grinnell (1917) quien destaca que las condiciones ambientales son las que definen el nicho de cada especie; por Elton (1927), quien enfatiza en la función que cumplen las especies; y por Hutchinson (1957), quien propuso tener en cuenta las condiciones bióticas y abióticas donde la especie puede o podría desarrollarse (Mota-vargas et al., 2019).

Los primeros registros en la predicción de la distribución de especies y comunidades se presentaron en la década de 1980. Austin (1987) trabajó con modelos estadísticos para medir el gradiente generado en la vegetación en relación con su ambiente. Luego, estos modelos fueron reemplazados por el algoritmo BIOCLIM, que se utiliza para generar modelos de distribución espacial de especies (Beaumont et al., 2005). Gracias al desarrollo y manejo de bases de datos surge el *software* necesario para poder determinar distribuciones geográficas de poblaciones, tomando como referencia datos de presencia o ausencia.

Los MNE pueden representar visualmente la cobertura del hábitat potencial o su abundancia, como así también, determinar la correspondencia entre variables climáticas y las georreferencias (Guisan & Zimmermann, 2000). Una de las técnicas utilizadas en el modelado de nicho ecológico es la llamada MaxEnt, basada en algoritmos que estima la probabilidad de encontrar una especie en una región, teniendo en cuenta los factores ambientales y la máxima entropía (Phillips & Dudík, 2008).

El Sistema de Información Geográfica (SIG) permite procedimientos sobre bases de datos descriptivas de objetos presentes en la naturaleza que pueden ser medidos, trabaja con georreferencias y con información de tipo espacial. Se utilizan las condiciones ambientales propicias donde puede desarrollarse una

especie determinada. Esto permite generar un modelo para situarla en otras regiones (Jarvis et al., 2005).

A través de estas herramientas también es posible realizar estudios sistemáticos y evolutivos, encontrar nuevos territorios para especies amenazadas, elaborar mapas de distribución, mapas de abundancia y riqueza de especies, comprender sus patrones de distribución y evaluar si su vulnerabilidad se debe a acciones provocadas por el ser humano o por los efectos del cambio climático (Peterson, 2001). Además, estas herramientas permiten la formulación de hipótesis sobre distribuciones poblacionales futuras, en diferentes escalas temporales que colaboran en la interpretación de diferentes contextos ambientales (Soberon & Peterson, 2005). Por tanto, es muy importante que el cambio climático sea tenido en cuenta en las estrategias de conservación y manejo de especies vulnerables. El análisis con herramientas SIG en la evaluación de la distribución de estas especies, permitiría una mejor planificación en su protección y sostenibilidad (Martínez-Meyer et al., 2006).

Conservación *ex situ*

A la conservación *ex situ*, puede definirse como el mantenimiento de los componentes de la biodiversidad fuera de sus hábitats naturales. Este es un proceso que involucra el almacenamiento de los recursos genéticos en bancos de germoplasma y el mantenimiento de colecciones silvestres (Brunetti, 2008; Vazquez et al., 2007). Por lo tanto, la conservación *ex situ* contribuye a la supervivencia de las especies y debe ser considerada para la situación de especies vulnerables o amenazadas.

Establecer una metodología para la propagación *in vitro* de *H. multiflora* es de suma importancia en su conservación y permitiría generar un banco de germoplasma *in vitro*, un banco a campo, como también, protocolos de introducción a su cultivo.

Plantas Aromáticas, Biodiversidad y Sobreexplotación

Las plantas aromáticas son aquellas cuyos principios activos están constituidos, total o parcialmente, por esencias. Estas especies aromáticas son requeridas por la industria alimenticia, especialmente porque poseen derivados que pueden emplearse en la industria de las bebidas sin alcohol (aguas saborizadas con propiedades funcionales otorgadas por extractos de la planta), la de bebidas alcohólicas preparadas en base a amargos de hierbas, en infusiones y en la yerba mate saborizada. También, dentro de la biocosmética, la inclusión de aceites esenciales, oleoresinas y extractos en la formulación de una fragancia le da atributos de genuinidad y permanencia con una mayor cotización en el mercado de los perfumes. Las plantas medicinales son aquellas que producen principios activos que ejercen una acción farmacológica sobre un organismo (Muñoz López de Bustamante, 1996). La flora medicinal nativa evaluada en Argentina comprende alrededor de 1529 taxones agrupados en 175 familias y 688 géneros. Las partes aéreas, como hojas y tallos herbáceos, son las partes más utilizadas en preparaciones medicinales, mientras que los tallos leñosos, los órganos subterráneos y las flores se utilizan en menor grado (Barboza et al., 2009). A modo de ejemplo, en la figura 1 se muestra un listado de beneficios y aplicaciones de estas especies (Palacio García-Nieto, 2000):

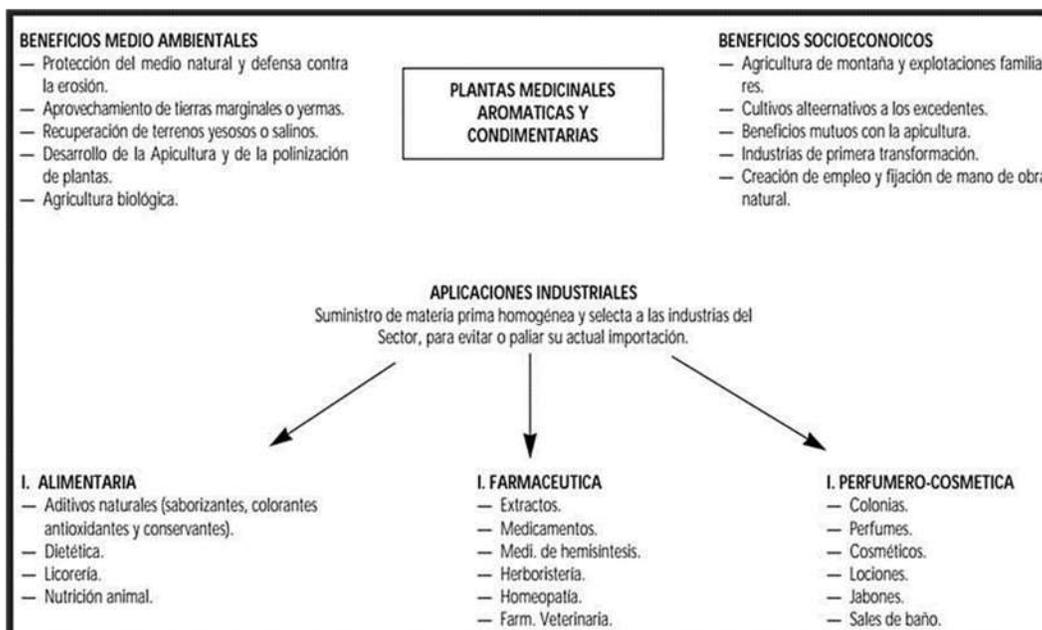


Figura 1: Utilización de PAM y sus principios activos proporcionan importantes beneficios medioambientales, económicos y sociales.

El aprovechamiento por el hombre de las PAM, así como la extracción y utilización de sus esencias, se remonta a la antigüedad, según consta en muchos testimonios históricos pertenecientes a distintas civilizaciones. La historia del hombre está estrechamente ligada con las plantas medicinales y aromáticas. La medicina herbaria, conocida también como medicina botánica, fitoterapia o fitomedicina, es la forma más antigua de administrar “remedios” que se ha conocido en la humanidad (Alvarez, 2019).

Los conocimientos que se poseen con respecto al uso de plantas medicinales y aromáticas han sido reportados por varios autores como el llamado “conocimiento botánico tradicional” que hace referencia a los saberes de las comunidades locales, en las que existe una relación con su entorno ambiental en lo referente a producción y consumo (McClatchey, 2005). Consiste en un conjunto de creencias, tradiciones y prácticas originadas de su interacción con el medio (Berkes, 1993; Toledo, 2005). En las zonas rurales, los que consumen son aquellos que producen, y conocen las propiedades de las plantas. Por otro lado, en las zonas urbanas, la sociedad en general está industrializada y la relación es indirecta, y muchas veces, se desconoce la procedencia, cómo se obtiene ese producto vegetal y cómo se produce (Pochettino et al., 2008). Actualmente, existen varios documentos e investigaciones relacionadas con el uso de las plantas para tratar diversas enfermedades (Del Vitto, et al., 1997; Pascual Casamayor et al., 2014).

La biodiversidad vegetal provee innumerables recursos, que son utilizados por el hombre, y se los conoce con el nombre de servicios ecosistémicos o servicios ambientales. Estos servicios benefician a la sociedad, pero por lo general, no tienen valor en el mercado y no son tomados en cuenta a la hora de tomar decisiones sobre los usos de la tierra. En lo referente a las plantas aromáticas y medicinales estos beneficios se refieren a la producción de alimentos, generación de productos agrícolas, productos comerciales o de abastecimiento y provisión de germoplasma. Afortunadamente, según Egoh et al. (2012), en los

últimos años ha aumentado el esfuerzo para estimar el valor de los bienes y servicios naturales, aunque existen muy pocos trabajos publicados que se centren en las PAM.

Argentina, gracias al amplio espectro de biomas que posee, tiene varias regiones para el establecimiento de plantas aromáticas, que permiten el autoabastecimiento regional de materia prima para diferentes industrias. Desde hace tiempo, la recolección de varias especies de aromáticas, se realiza desde Río Negro hacia el Norte de nuestro país, directamente de su ambiente natural. (Elechosa et al., 2009).

Ya desde la década del 60, se introduce la problemática de incrementar la producción de plantas aromáticas nativas, especialmente de aquellas especies cuyas esencias pueden tener un amplio mercado, además de la necesidad de divulgar sus propiedades (Montes, 1964). Por tal motivo, actualmente, se requiere un aprovechamiento racional que contribuya a lograr un desarrollo sustentable de las economías regionales. En general, en la mayoría de los casos, no se llevan a cabo buenas prácticas de recolección, es importante considerar la pérdida del potencial económico, social y cultural de este germoplasma, producto de un aprovechamiento poco sustentable. Los cultivos no comerciales forman parte de un grupo de especies domesticadas y silvestres, que en general han sido desplazadas de la agricultura convencional por varios motivos, culturales, sociales, agronómicos, genéticos, económicas, etc. (Padulosi & Hoeschle-Zeledon, 2004).

El cambio climático, la sobreexplotación, la pérdida del hábitat natural y el cambio en el uso de la tierra pueden provocar grandes disturbios en la biodiversidad, generando que muchas especies experimenten situaciones críticas. Dichos procesos podrían ser analizados desde diferentes abordajes, el más obvio y directo es la degradación de los recursos genéticos nativos. Actualmente, las respuestas a estos procesos son aproximadas o parciales, por lo que es importante generar estrategias para su conservación.

Descripción de la especie en estudio

Hedeoma multiflora Benth. (Lamiaceae) es una planta pequeña y su crecimiento está confinado a condiciones ambientales restrictivas (Figura 2). Es perenne y muy aromática. Se desarrolla formando matas pequeñas de hasta 30 cm de altura aproximadamente, cuyos tallos son algo decumbentes y hojas sésiles, que contienen el aceite esencial (Anton & Zuloaga, 2018). Habita en lomas secas, pedregosas y ambientes serranos, hasta los 1000 msnm (Elechosa et al., 2009). Se distribuye en Argentina, Uruguay y Brasil. Dentro de nuestro país fue reportada por Fester et al. (1961) en Buenos Aires, Mendoza, Catamarca, Entre Ríos, Córdoba, La Pampa, Río Negro, Santiago del Estero y San Luis (Irving, 1980).

Varios autores han indicado que la especie tiene un alto grado de homogeneidad en la composición química de sus aceites esenciales. Los componentes principales son: pulegona, mentona e isomentona. Esto indicaría que es un solo quimiotipo específico y estable, al menos en las ubicaciones evaluadas (Fester et al., 1961; Juárez et al., 2018; Montes, 1964; van Baren et al., 2010). Sin embargo, también se observa que los porcentajes de estos componentes pueden variar según el momento del año, el estado fisiológico de la planta, el clima y edad de la planta.

En cuanto a sus usos en medicina popular, *H. multiflora* es utilizada para afecciones abdominales y estomacales como la gastritis en forma de infusión (Goleniowski et al., 2006), úlceras y hemorroides (Lagrotteria & Lozada 1993; Menseguez et al, 2007; Luján & Martínez 2017, 2019), y por la actividad antioxidante de la infusión de sus hojas debido al alto contenido de fenoles y flavonoides. Es importante destacar que, aunque se la emplea en la medicina popular para diferentes afecciones, *H. multiflora* no se encuentra en la Farmacopea Argentina (Farmacopea Argentina Septima edición 2017).

Por otra parte, en la industria de las bebidas sin alcohol, es requerida por las procesadoras de yerba mate (*Ilex paraguarensis*) compuesta que la utiliza como

aromatizante (Bocco et al. 1993; Martínez 2005). También en la industria de las bebidas alcohólicas preparadas en base a amargos de hierbas y aperitivos (Lagrotteria & Lozada, 1993).



Figura 2: Aspecto general de la planta adulta (a), detalle de la flor (b) y hojas (c).

Se la conoce popularmente como tomillo, menta del campo, peperina de las lomas, peperina puntana, peperina de la sierra, tomillo serrano, tomillo del campo, cominito del campo, mastuerzo, hierba del pájaro (Elechosa et al., 2009) y tomillito de la sierra (Ordóñez et al., 2006).

Metodología general

Se realizó la búsqueda bibliográfica en bases de datos indexadas, en inglés y en español. También se visitaron bibliotecas y herbarios para la recolección de datos y obtener una aproximación general de la problemática. Al concluir el estado del arte de la especie fue evidente que existen pocos trabajos de investigación y son antiguos. También, se tomaron datos *in situ* (ver anexo 1). Se planteó una colección de 2 años de duración, en los meses de enero a febrero, una población por año: San Luis y La Pampa.

Si bien la especie se distribuye en varias provincias solo se pudo gestionar la autorización para realizar investigaciones en la provincia de San Luis y solicitud de investigación en la APN (Parque Nacional Lihué Calel – La Pampa) por ahora.

Para cada población, se realizaron las correspondientes colecciones de material vegetal en el campo. Se colectaron plantas vivas, semillas y especímenes para herbario.

- Para plantas vivas, se tomaron fotografías de su ambiente en general, se descalzó suavemente la planta entera, sin dañar las raíces, se la colocó en macetas conteniendo el mismo sustrato y se rotuló cada individuo.
- Para semillas, se cortó una rama con frutos maduros por planta, se la dispuso en sobre de papel debidamente rotulado.
- Para especímenes de herbario (muestra de referencia), se sacaron dos individuos representativos, se prensaron entre papel de diario y prensa de madera

Los criterios para seleccionar y definir las zonas de recolección se basaron en el patrón espacial típico a la población en su área de estudio. Los datos a evaluar fueron:

A.- Observación en el sitio de origen, desarrollo y arquitectura de las plantas, características del suelo, clima, condiciones de crecimiento.

B.- Colección de material vegetal: para plantas vivas, se tomaron fotografías de su ambiente en general, se descalzó suavemente la planta entera con una pala, sin dañar las raíces, se la colocó en macetas conteniendo el mismo sustrato y se rotuló cada individuo. Para semillas, se cortó una rama con frutos maduros por planta, se la dispuso en sobre de papel debidamente rotulado. Para especímenes de herbario (muestra de referencia), se sacaron dos individuos representativos, se prensaron entre papel de diario y prensa de madera.

Para evaluar la respuesta ante el cambio climático de *Hedeoma multiflora*, se utilizaron imágenes satelitales en diferentes períodos, con el propósito de mostrar el avance de la frontera agropecuaria e industrial en la zona de estudio.

Para el modelado de nicho ecológico, se tomaron coordenadas de la recolección de campo, de etiquetas de herbario y páginas on line de herbarios con datos georreferenciados. Se utilizaron 19 variables bioclimáticas más elevación, extraídas de la base de datos WORLDCLIM 2¹ a una resolución de 2,5 minutos de arco. Se tomaron cinco variables edáficas para las capas de suelo de SOILGRIDS™². Se tomaron dos criterios de la Lista Roja de la UICN: el grado de ocurrencia y el área de ocupación.

Para el protocolo de cultivo de tejidos vegetales, se seleccionó el tipo de explanto (hoja, segmento uninodal y segmento binodal). Luego se realizó la desinfección, introducción, establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación correspondiente. Para el protocolo de multiplicación, se evaluaron diferentes concentraciones de BAP (6-Bencilaminopurina) e IBA (ácido indol-3-butírico). En medio MS completo a 25°C. Para el protocolo de conservación, los explantos se cultivaron en MS diluído a la mitad a 19°C. Ambos procesos bajo un FP 16:8.

¹ <http://www.worldclim.org>

² <https://www.isric.org>

En la Aclimatación, primero se realizó en sala de cultivo y posteriormente en invernáculo.

Para la introducción a cultivo se realizó un ensayo de implantación de individuos *ex vitro* en el campo experimental del Instituto de Recursos Biológicos de INTA Castelar.

Capítulo 1: Estado de vulnerabilidad

Marco teórico

Las PAM deben hacer frente al deterioro poblacional y ambiental provocado por otras acciones antrópicas, como la expansión de la frontera agrícola-ganadera debido al creciente aprovechamiento de campos para cultivos tradicionales, aumento de las urbanizaciones, incendios provocados o accidentales, emprendimientos turísticos, etc. (Elechosa et al., 2009). Dentro de este conjunto de situaciones adversas, se encuentra *H. multiflora* (Anexo 2), pero no se encontraron informes regionales oficiales sobre la oferta y demanda de esta especie, aunque es uno de los mejores pagos por su dificultad para encontrarla, su tamaño y tiempo de recolección (Galli, 2013).

Las dos poblaciones que se tomaron como referencia están afectadas por una o varias situaciones nombradas anteriormente, aunque se desarrollan en diferentes ambientes.

La población SL se desarrolla en el bosque chaqueño, donde predomina la vegetación de característica xerófila y prevalecen especies caducifolias, de hojas pequeñas o transformadas en espinas. Debido a la distribución de las precipitaciones, las formaciones vegetales van disminuyendo de este a oeste. El clima es del tipo Mediterráneo Seco. Hay escasa regulación marina por lo que hay gran amplitud térmica, lo que provoca el resquebrajamiento de las rocas y el suelo. La temperatura media anual es de 20°C, en verano se alcanzan temperaturas de 35°C mientras que en los meses de invierno se pueden registrar temperaturas de -5° C (Figura 3a) (Cabrera, 1971).

La población LP se presenta en la zona semiárida central, en la formación del espinal, donde predominan especies leñosas con espinas. Es una región con relieves poco ondulados, con suelos poco desarrollados, loessoides, con capas petrocálcicas y arenosos de textura gruesa. Clima subhúmedo seco y semiárido (Figura 3b) (Cabrera, 1971).



Figura 3. Ambiente de la población SL (a) y población LP (b). Se indica con una estrella un ejemplar de *H. multiflora*.

Objetivo

Determinar el estado de vulnerabilidad *in situ* de dos poblaciones de *Hedeoma multiflora* tomadas como modelo.

Materiales y métodos

Para evidenciar el deterioro en la distribución de la especie, se recolectó material vegetal y muestras de suelo de la provincia de San Luis (población SL Carpintería y SL Ruta 23) y provincia de La Pampa (población LP). Las georreferencias se indican en las Figuras 4 y 5. Con el propósito de mostrar el avance de la frontera agropecuaria e industrial en la zona de estudio, se utilizaron imágenes satelitales del sitio web GoogleMaps³. Corresponden a un período de aproximadamente 15 a 20 años, dependiendo de la región de estudio.

³ <http://www.maps.google.com>



Figura 4: Localización de las poblaciones en la provincia de San Luis (Los Duraznos: -32.29377, -65.22143 y Carpintería: -32.4204, -64.9748)

Figura 5: Localización de la población en la provincia de La Pampa: -37.76041, -64.74447

Resultados

El patrón espacial observado para ambas poblaciones se basa en una distribución agrupada, dependiendo del refugio otorgado por rocas grandes o arbustos medianos no competidores.

En la población SL, se evidencia un aumento en la urbanización, terrenos cercados y caminos principales y secundarios. En algunos de esos terrenos, presencia de ganado y suelo pisoteado y compactado. En la población LP, el avance inmobiliario no fue tan evidente, pero la principal observación que llamó la atención fueron los manchones de terreno quemado y la alteración del área por el asfaltado de la ruta. En la figura 6 se muestra la variación en el uso de la tierra en un promedio de 20 años.

Con respecto al estudio del suelo, ambos son similares, los resultados son consistentes con los parámetros esperados (Anexo 3) con una saturación media, pH ligeramente alcalino y escasa materia orgánica.

El patrón espacial observado para ambas poblaciones se basa en una distribución agrupada.

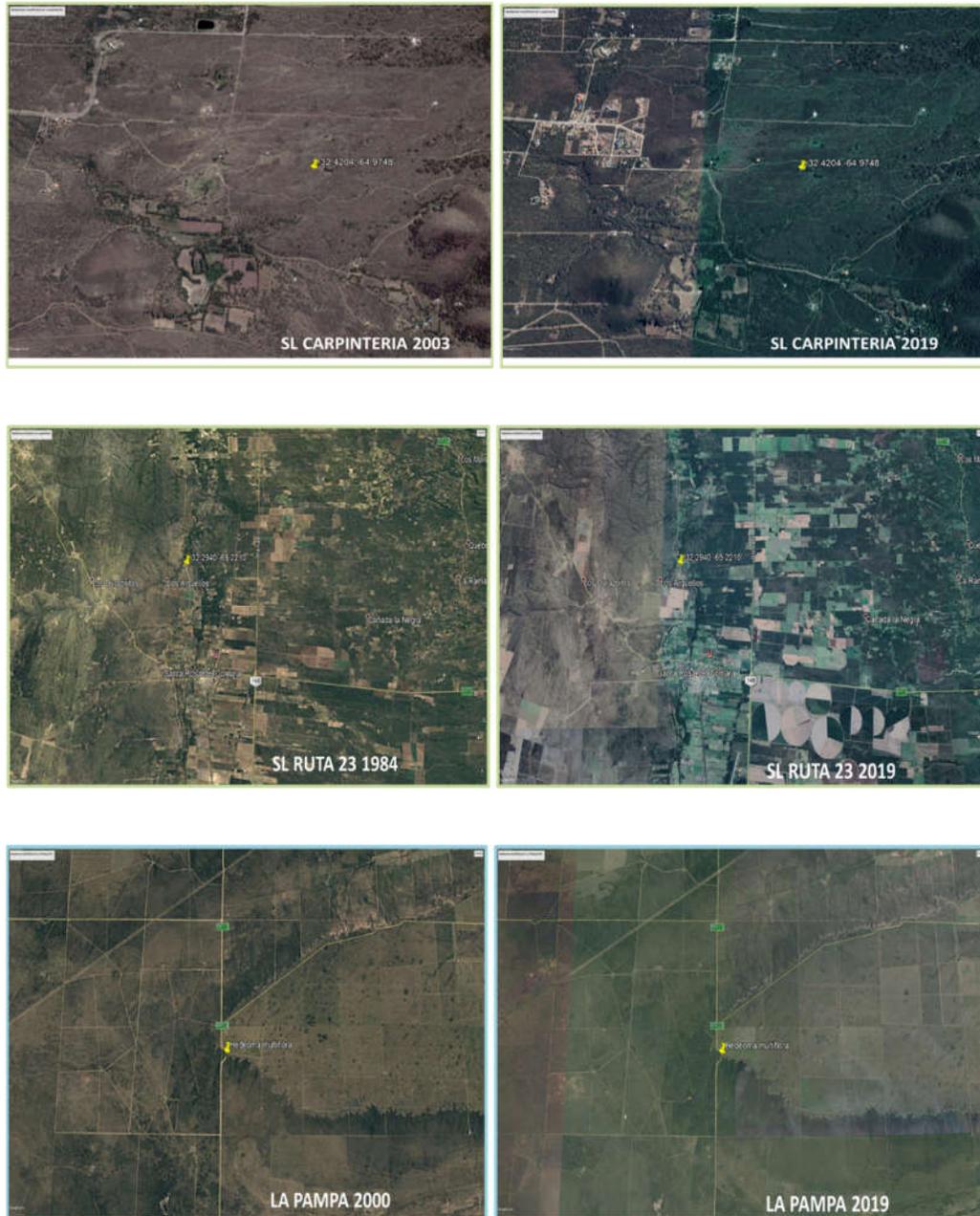


Figura 6: Vista general de los sitios de recolección (marcador amarillo) en la actualidad y en el pasado. En las regiones de San Luis se puede ver el avance inmobiliario y zonas de cultivo. En la región de La Pampa, el aumento de la desertificación y disminución de la densidad vegetal.

El marcador amarillo indica el sitio de colecta.

Discusión

La distribución agrupada observada para las poblaciones evaluadas, ocurre cuando los individuos tienden a sobrevivir en sectores particulares del entorno, el resultado es que éstos están más cerca de lo esperado por azar. Es importante tener en cuenta la importancia del clima en la determinación de la distribución y abundancia de las especies. La distribución de los biomas coincide con la altitud y con las zonas de rangos de temperatura. Esta distribución, generalmente está limitada por condiciones que son subóptimas y que llevan a una reducción del crecimiento poblacional, o a un aumento de las probabilidades de mortalidad (Begon et al., 2006).

Con respecto a las evidencias del deterioro ambiental y grado de vulnerabilidad de la especie, las observaciones *in situ* fueron diferentes en cierto grado para cada población, como es el caso del avance urbano. Aunque en entrevistas con lugareños, se plantea como principales factores desfavorables, el avance de la frontera agropecuaria e industrial, el turismo y los incendios, a veces provocados. Esto coincide con lo presentado por Arias Toledo et al. (2010) quienes afirman que las actividades humanas provocan variaciones sobre la abundancia de las especies. Los diferentes usos del suelo, especialmente la agricultura intensiva y el aumento de la urbanización, serían las actividades más influyentes en la modificación del hábitat.

Conclusiones

- Se ha determinado que el nivel de riesgo ambiental por causas antrópicas es diferente en las dos poblaciones en estudio.
- La disminución de las poblaciones y el aumento de los parches debido a la fragmentación del hábitat es evidenciada por los lugareños desde hace tiempo.

Capítulo 2: Evaluación frente al cambio climático

Marco teórico

Muchas especies están amenazadas en su ambiente debido al cambio climático, según el IPCC (2014), se estima que el aumento de la temperatura global a finales del siglo XXI será superior a los 2°C. Este proceso afecta la distribución y el crecimiento de las poblaciones, más allá de cambios a gran escala en la dinámica de los ecosistemas. Además, las diferentes distribuciones de las especies, debido a las condiciones ambientales, controlan su evolución (Ai et al., 2013).

Se producirán cambios en el patrón climático que afectarán la productividad vegetal en el futuro (Reddy et al., 2010), en las distribuciones geográficas (Lenoir & Svenning, 2015) y alteraciones en la composición, estructura y fenología de las poblaciones (Van Der Putten et al., 2010).

En América del Sur, el cambio climático puede impactar en varios aspectos (Reyer et al., 2017), por ejemplo, en el sureste de Brasil se pronosticó un aumento de la temperatura media anual y un aumento de la precipitación anual para fines de siglo (Chou et al., 2014). En Argentina, las proyecciones climáticas futuras predijeron un clima más cálido (Collins & Knutti, 2013; Orłowsky & Seneviratne, 2011) y un incremento en las precipitaciones en las regiones norte y central para fines de siglo (2016-2100) (Barros et al., 2015). Paralelamente, en la región de Uruguay, las simulaciones de modelos climáticos futuros indican aumentos de temperatura y precipitación, y períodos más largos de sequía e inundaciones en un clima más cálido (Eleftheratos et al., 2011).

Además del cambio climático, algunas especies vegetales pueden experimentar situaciones críticas debido a la sobreexplotación, la pérdida de hábitat natural y el cambio en el uso de la tierra. En conjunto, pueden causar importantes alteraciones en la biodiversidad. En muchas especies no se ha estimado el impacto de estos procesos, por lo que es importante desarrollar metodologías

para evaluar estos efectos y establecer estrategias de conservación en especies vulnerables. Como primer paso, es necesario seleccionar, resumir y mapear la información biológica obtenida de la investigación científica y de las colecciones depositadas en herbarios (Lobo & Hortal, 2003).

Hedeoma multiflora se distribuye en Argentina, Uruguay y Brasil (Fig. 7). La especie habita en la región biogeográfica Neotropical, en el dominio Chaco y dentro de las provincias Chaqueña y Pampeana. La provincia del Chaco (Argentina) es la de mayor volumen de vegetación. Está conformado por llanuras y cerros bajos, con un clima continental con una temperatura promedio anual entre 20 a 23°C y veranos lluviosos. La vegetación predominantemente xerofítica, con un estrato herbáceo. La provincia Pampeana (Argentina, Uruguay y Brasil) tiene llanuras levemente onduladas, un clima templado a cálido con una temperatura media anual entre 13 y 17°C y lluvias anuales que disminuyen de norte a sur y de este a oeste. La vegetación predominante son pastos herbáceos y arbustos (Cabrera & Willink, 1973).

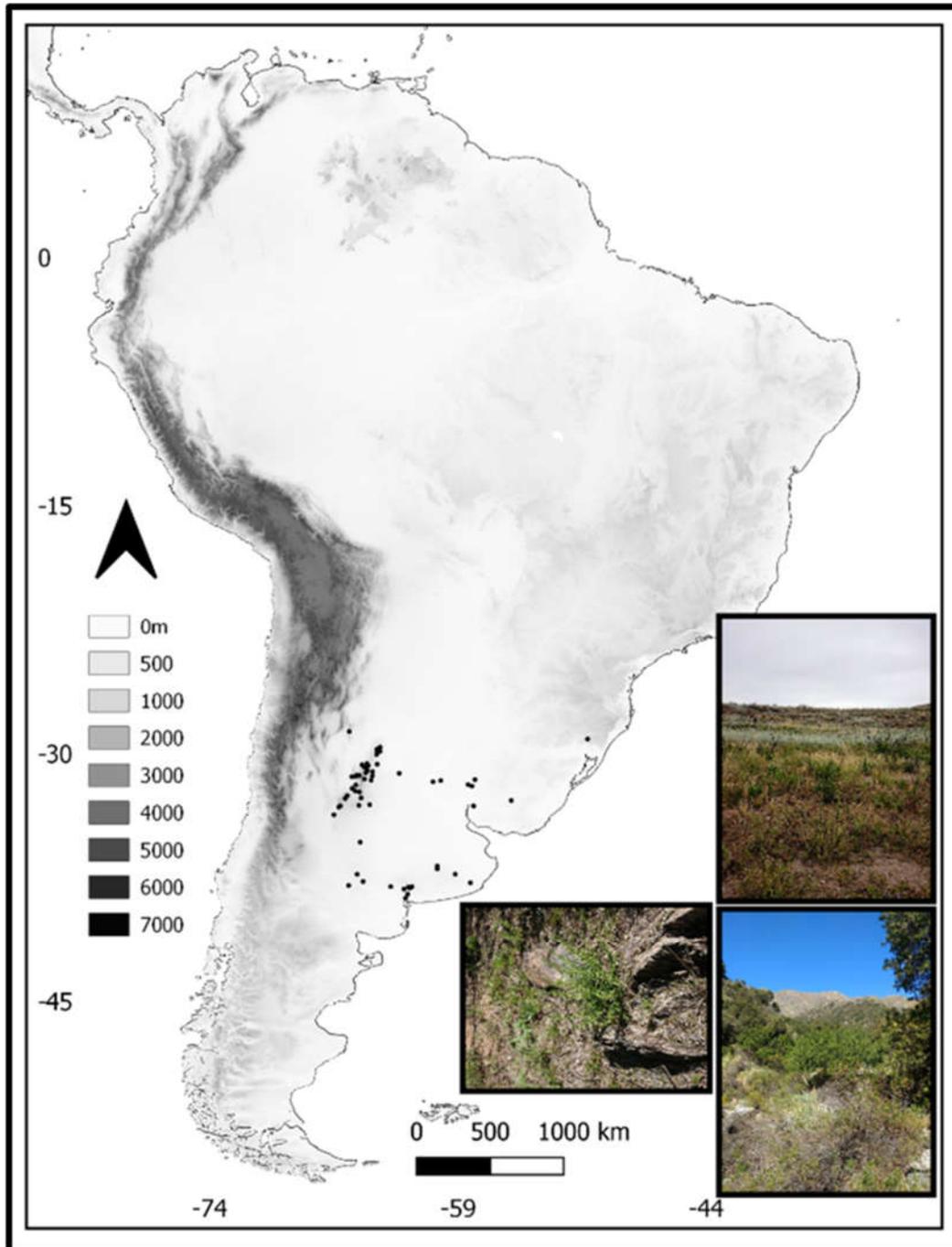


Figura 7. Distribución actual de *H. multiflora*. Se observan diferentes ecosistemas donde habita: provincia del Chaco (abajo) y provincia Pampeana (arriba).

Objetivo

Identificar el grado de vulnerabilidad y los factores que contribuyen a la distribución actual y futura de esta especie mediante el modelado de nicho ecológico.

Estimar la importancia de los factores abióticos en la distribución geográfica de *Hedeoma multiflora*

Materiales y métodos

Se obtuvieron 151 coordenadas entre la recolección de campo, de materiales de herbario (BAB, CORD y SI) y la base de datos GBIF⁴. Para evitar un efecto de autocorrelación espacial en MNE, los puntos que se encontraban a menos de 5 km de distancia se eliminaron mediante el paquete R "Wallace" Versión 1.0.6.1 (Kass et al., 2018) implementado en R Versión 3.6.1, obteniendo en total 63 puntos de América del Sur (archivo suplementario). Se usaron 19 variables bioclimáticas y, además, elevación, extraídas de la base de datos WORLDCLIM 2 con una resolución de 2.5 minutos de arco (Hijmans et al., 2005). La pendiente se calculó a partir de la elevación en el "Sistema de información geográfica" de QGIS ver. 3.4.12 (Equipo de desarrollo de QGIS, 2018). Se tomaron cinco variables edáficas para las capas de suelo de SOILGRIDS™ a una resolución de 250 m y 5 cm de profundidad (Hengl et al., 2017). Todas las capas se recortaron al área de calibración que se definió de acuerdo con el enfoque teórico de movilidad biótica-abiótica (Peterson et al., 2008; Soberon & Peterson, 2005). En este estudio, dado que el objetivo es identificar áreas adecuadas para la conservación y cultivo de *H. multiflora*, el enfoque se realizó en América del Sur. Para minimizar el ajuste sesgado de los modelos producido por la covarianza entre variables y los consiguientes resultados engañosos, se redujeron algunos datos debido a la multicolinealidad; para ello se realizó una Correlación de Pearson para identificar pares de variables con alto grado de correlación ($r > 0.8$).

⁴ www.gbif.org

Se seleccionaron las siguientes variables: Elevación, Pendiente, Bio1 (temperatura media anual), Bio2 (rango medio diurno), Bio3 (rango de isothermalidad), Bio7 (rango de temperatura anual), Bio12 (precipitación anual), Bio15 (estacionalidad de la precipitación), Bio18 (precipitación del trimestre más cálido), BLDFIE (densidad aparente), CLYPPT (contenido de arcilla), CRFVOL (fragmento grueso volumétrico), ORCDRC (contenido de carbono orgánico del suelo), PHIHOX (pH del suelo). Se seleccionaron las variables bioclimáticas y las propiedades del suelo por considerarse biológicamente significativas y directamente relevantes para esta especie. Las pruebas de correlación se realizaron utilizando INFOSTAT 2.0 (Di Rienzo et al., 2018).

El escenario RCP 6.0 (Vías de concentración representativas) para el año 2070 (2060-2080) propuesto por el Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (IPCC) se utilizó para realizar modelos de nicho futuros. Se utilizaron tres modelos diferentes de circulación global atmósfera-océano (AOGCM): CCSM4 (modelo de sistema climático comunitario, versión 4), CGCM3 (modelo de circulación general atmosférica de cuarta generación) y HadGEM2 (modelo ambiental global del centro Hadley, versión 2). Estos tres AOGCM se seleccionaron dada la incertidumbre introducida por estos modelos para las condiciones futuras (Diniz-Filho et al., 2009; Nori et al., 2011), y para cubrir el rango de variación entre estos. Para construir este modelo, se utilizó el promedio de las variables bioclimáticas seleccionadas de estos tres AOGCM.

El modelado de nichos ecológicos se ha empleado para evaluar los nichos potenciales presentes y futuros de *Hedeoma multiflora*. Se ejecutaron en MaxEnt utilizando la siguiente configuración: umbral de convergencia = 10^{-5} , iteraciones máximas = 20.000, multiplicador de regularización = 1, réplicas = 10 y tipo de ejecución de réplicas = validación cruzada. MaxEnt usa solo datos de presencia de especies y funciona bien con muestras pequeñas (Hernandez et al., 2006; Phillips et al., 2006). Posteriormente, los modelos fueron evaluados por el área bajo la curva característica de funcionamiento del receptor (AUC) (Lobo et al., 2008; Townsend Peterson, 2007). Las puntuaciones de AUC se calcularon primero usando todos los registros y luego usando 75% de entrenamiento versus

25% de conjuntos de datos de prueba (Fielding & Bell, 1997). También se realizó una prueba de navaja (jackknife test) para evaluar la importancia relativa de las variables.

Los modelos de *Hedeoma multiflora* se almacenaron en formato ráster ASCII y se importaron al QGIS para trazar los mapas utilizando los valores promedio de los umbrales de densidad proporcionados por MaxEnt. Estos umbrales están representados por diferentes colores para indicar la probabilidad predicha, con valores en un rango de 1 -> 0,8 (rojo oscuro) para la probabilidad predicha más alta; 0,8 -> 0,6 (rojo) para la probabilidad predicha alta; 0,6 -> 0,4 (rosa) para probabilidad pronosticada media; 0,4 -> 0,2 (rosa claro) para una probabilidad pronosticada baja y 0,2 -> 0,0 (blanco) para probabilidad pronosticada muy baja. Finalmente, las proyecciones MaxEnt se reclasificaron para convertir la salida de datos en un mapa de presencia / ausencia (0-1), utilizando un umbral de Presencia mínima de entrenamiento (MTP), para obtener el área de distribución potencial total en km² para las predicciones actuales y futuras.

Para estimar un estado de amenaza preliminar de *Hedeoma multiflora*, se calcularon dos variables adaptadas de los criterios de la Lista Roja de la UICN (Comité de Normas y Peticiones de la UICN 2019): el grado de ocurrencia (extent of occurrence - EOO) y el área de ocupación (area of occupancy - AOO) utilizando los puntos de ocurrencia. EOO crea el límite continuo más corto posible que abarca todos los puntos de ocurrencia y calcula el área dentro del límite para estimar qué tan extendido está un taxón. El AOO estima el área dentro del EOO, que en realidad está ocupada por un taxón calculando el número mínimo cuadrículas de 2 km² necesarias para cubrir todos los puntos de ocurrencia.

Estos cálculos se realizaron utilizando la herramienta de evaluación de la conservación geoespacial GeoCAT (Bachman et al., 2011). Para clasificar *H. multiflora* usando estas dos variables, se implementaron los criterios propuestos por la Comisión de Normas y Peticiones de la UICN (2019):

- En peligro crítico cuando $EOO < 100 \text{ km}^2$ o $AOO < 10 \text{ km}^2$.
- En peligro cuando $100 \text{ km}^2 < EOO < 5000 \text{ km}^2$ o $10 \text{ km}^2 < AOO < 500 \text{ km}^2$.
- Vulnerable cuando $5000 \text{ km}^2 < EOO < 20000 \text{ km}^2$ o $500 \text{ km}^2 < AOO < 2000 \text{ km}^2$.
- Casi amenazado cuando $20000 \text{ km}^2 > EOO < 45000 \text{ km}^2$ o $2000 \text{ km}^2 < AOO < 4500 \text{ km}^2$
- Preocupación menor cuando $EOO \geq 45000 \text{ km}^2$ y $AOO \geq 4500 \text{ km}^2$

Aunque estas dos métricas no representan el conjunto completo de criterios necesarios para la clasificación en la Lista Roja, son indicaciones útiles del estado de vulnerabilidad de un taxón (Myrans et al., 2020).

Resultados

Al realizar el MNE, los resultados arrojan que en los próximos 50 años la distribución de la especie se incrementará levemente, sin considerar en los análisis las actividades humanas. Las distribuciones potenciales presentes y futuras de *Hedeoma multiflora* basadas en el algoritmo de Maxent se presentan en la Fig. 8. El rango de distribución potencial de *H. multiflora* en las condiciones climáticas actuales comprende un total de 471989 km², habita principalmente en la región central de Argentina y en el futuro, la predicción alcanza un total de 928776 km² ocurriendo principalmente en la región centro y centro-este de Argentina.

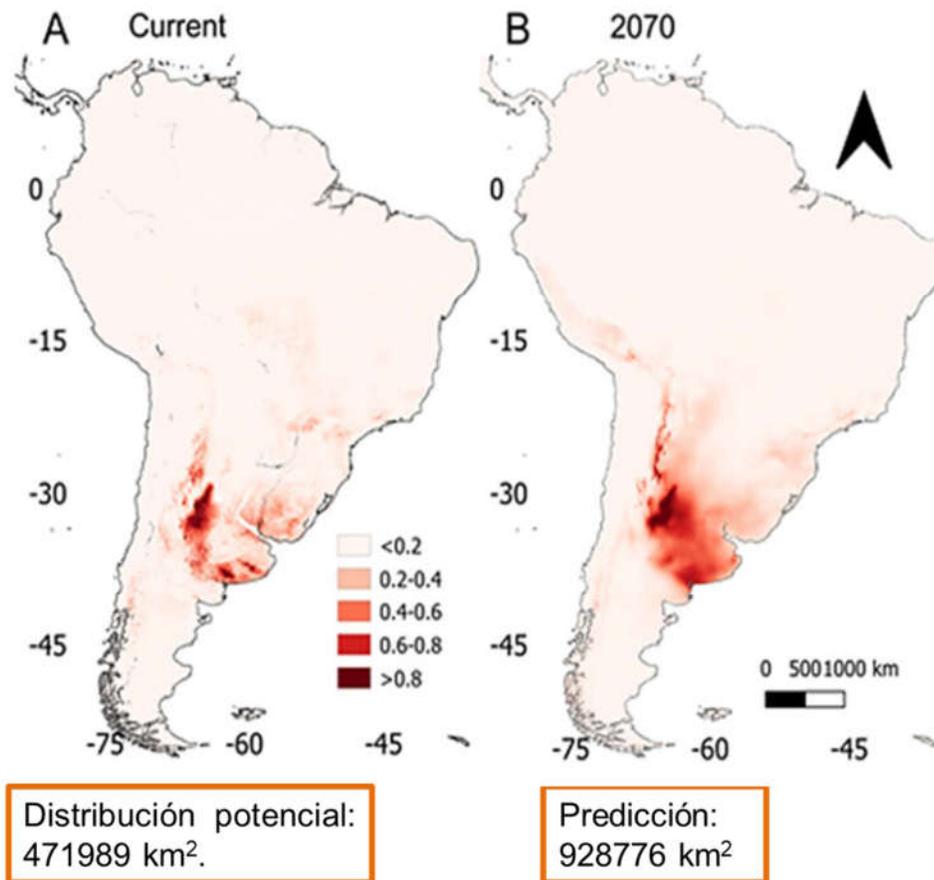


Figura 8: Distribución actual (izquierda) y 2070 (derecha) de *Hedeoma multiflora* en América del Sur.

Los resultados de MNE indican que los modelos respondieron bien (utilizando todos los registros y datos de pruebas de entrenamiento con $AUC > 0,95$). El AUC fue mejor que el aleatorio (es decir, los valores del AUC del modelo excedieron el percentil 95 de las distribuciones nulas del AUC).

Las variables que más contribuyeron a los modelos fueron Bio7 (rango de temperatura anual), Bio18 (precipitación del trimestre más cálido), Bio3 (isotermalidad) y Pendiente. Todas las demás variables juntas contribuyeron con menos del 10% (Tabla 1).

Tabla 1: Contribuciones relativas de las variables ambientales utilizadas con el algoritmo MaxEnt en la predicción de la distribución actual de *H. multiflora*.

Variables	Porcentaje de contribución (%)	Importancia de la permutación
Bio7 (rango de temperatura anual)	45.5	45.4
Bio18 (precipitación del trimestre más cálido)	13.5	9.6
Bio3 (rango de isothermalidad)	12.3	0
Pendiente	10.4	4.5
Bio1 (temperatura media anual)	7.4	22.3
Elevación	3.2	1.9
CRFVOL (fragmento grueso volumétrico)	3.0	6.1
Bio15 (estacionalidad de la precipitación)	3.0	1.5
ORCDRC (contenido de carbono orgánico del suelo)	2.3	0.2
CLYPPT (contenido de arcilla)	1.8	2.7
PHIHOX (pH del suelo)	0.9	5.3
Bio12 (precipitación anual)	0.6	0.1
BLDFIE (densidad aparente)	0.1	0
Bio2 (rango medio diurno)	0.1	0.3

Los valores óptimos de estas variables fueron los siguientes: rango de temperatura anual varió entre 7.18 a 39.78 °C, la precipitación del trimestre más cálido varió de 0 a 1734 mm, rango de isothermalidad de 31 a 92 % (Fig. 9). En la prueba Jackknife, Bio1 (temperatura media anual) y Bio7 (rango de temperatura anual) mostraron la mayor ganancia cuando se usaron de forma aislada y las variables que más redujeron la ganancia cuando se omitieron fueron CLYPPT (contenido de arcilla) y Pendiente. Los valores que se muestran son promedios de las diez repeticiones (Fig. 10).

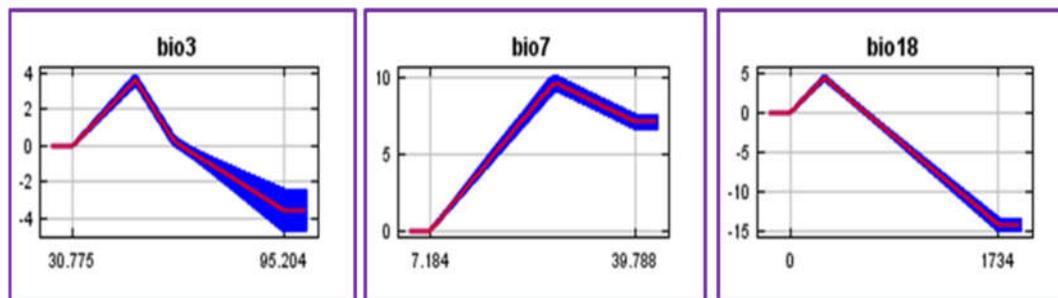


Figura 9: valores óptimos de las variables “rango de isothermalidad” (Bio3), “rango de temperatura anual” (Bio7) y “precipitación del trimestre más cálido” (Bio18).

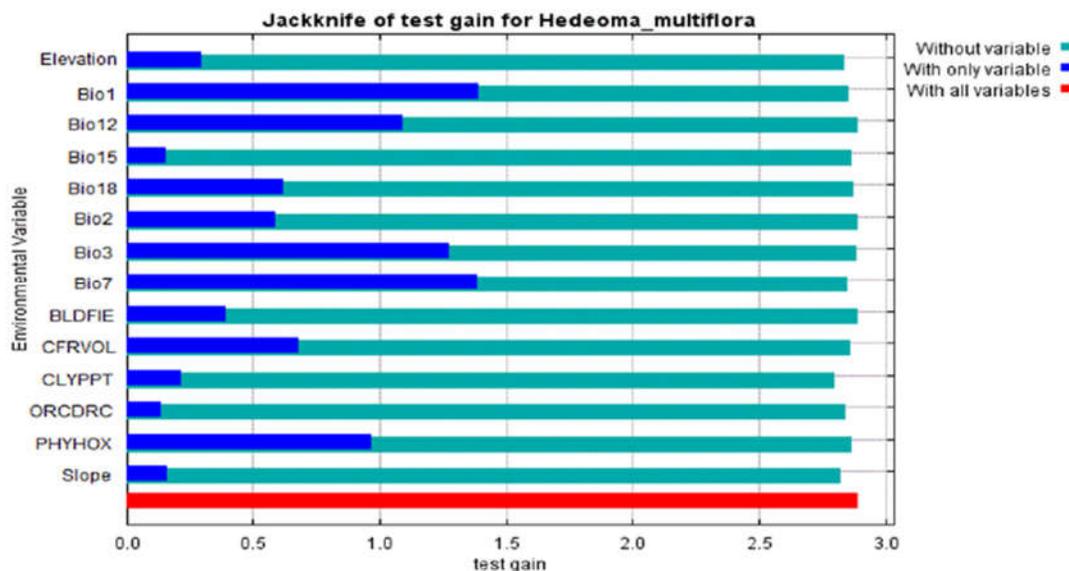


Figura 10. Ganancia de Jacknife test. Se muestra la importancia relativa de las variables ambientales para *H. multiflora*

Para *H. multiflora*, el EOO y AOO fueron 1.088.337,6 km² y 270 km² respectivamente. Según el valor de EOO, esta especie puede considerarse como de menor preocupación, pero según el valor de AOO, puede considerarse como especie en peligro de extinción.

Discusión

El cambio climático afecta profundamente la distribución de las especies y sus entornos. Hoy en día, la modelización de nichos ecológicos futuros es una herramienta muy importante para evaluar el impacto potencial del cambio climático en la biodiversidad (Wiens et al., 2009), estableciendo planes de conservación y estrategias de gestión adecuados (Hossell et al., 2003; Rutherford et al., 1999), identificar especies en riesgo de extinción (Brereton et al., 1995; Thomas et al., 2004) y proyectar la distribución actual y futura de especies vulnerables (Porfirio et al., 2014; Sinclair et al., 2010).

Este modelo bajo las condiciones climáticas actuales reveló que las áreas más adecuadas corresponden al Bosque Chaqueño Serrano en el sistema de las Sierras Pampeanas en las provincias de San Luis y Córdoba y, al sureste de Buenos Aires, en el sistema de las Sierras de Tandil. La distribución futura se extiende a las regiones bajas y planas de la provincia fitogeográfica Pampeana, a la región Espinal y también al este de la provincia Paranaense.

El análisis MNE reveló que el rango de temperatura variable anual fue el que tuvo mayor influencia en la distribución de *H. multiflora*. Esto sugiere que esta variable climática puede ser biológicamente significativa porque está asociada con la germinación y su dispersión. Esto es consistente con la determinación del poder de germinación del 60% a 25°C en semillas silvestres, en pruebas *in vitro* (Peralta et al., 2019; Sosa et al., 2019). Las variables “precipitación trimestre más cálido”, “isotermalidad” y “pendiente” también tienen una contribución considerable en el modelo. Con respecto a esta última variable, esta especie vive en las laderas de cerros y sierras bajas, con buen drenaje y resguardada del viento, por lo tanto, es consistente con el aporte. Por el contrario, las características del suelo no contribuyeron significativamente a la construcción del modelo, lo que sugiere que las variables climáticas son más relevantes para delinear la distribución geográfica de esta especie.

Un resultado inesperado es que *H. multiflora* expandió su distribución geográfica en lugar de contraerse con el calentamiento climático futuro. Se han reportado patrones similares en plantas de ambientes similares en América del Norte y Asia (DeChaine et al., 2013; Forester et al., 2013). Una explicación de este patrón podría ser que las temperaturas más cálidas y las lluvias más altas en condiciones de calentamiento futuras podrían cambiar regiones inadecuadas y favorecer el establecimiento de ésta especie en áreas no colonizadas.

Como especie endémica con distribución geográfica restringida, *H. multiflora* es altamente susceptible a la extinción (Kani, 2011; Pires et al., 2006). Aunque este modelo predice un aumento en el área de alta idoneidad en el futuro, estas áreas están actualmente afectadas por diferentes intervenciones humanas. En el

último año el Bosque Chaqueño Serrano en la provincia de San Luis y Córdoba experimentó una importante transformación paisajística provocada por el avance de la urbanización, incendios, tala indiscriminada, sobrepastoreo e invasión de especies exóticas (Cingolani et al., 2008; Gavier & Bucher, 2004; Giorgis et al., 2005; Renison et al., 2010; Zak et al., 2004). Pero el problema más grave a enfrentar por esta especie, es la recolección indiscriminada determinada por la demanda de industrias yerbateras o de bebidas sin alcohol, entre otras (Martínez 2005). Además, en esta práctica, se suele descalzar la planta entera, facilitado por las características del suelo, y con ello también, se impide la dispersión de las semillas de manera natural (Elechosa et al., 2009).

Según Giorgis et al. (2005) estas transformaciones afectan el establecimiento y supervivencia de especies nativas. En consecuencia, el hecho de que el cambio climático tendría un impacto positivo en la germinación y en la distribución de esta especie, el aumento de perturbaciones antrópicas en el ambiente de ocurrencia, sugiere que esta especie seguirá en riesgo, si no se toman las medidas necesarias para su protección. De hecho, la conservación y reintroducción de la especie se puede abordar en áreas donde los modelos actuales y futuros predicen hábitats alta y moderadamente adecuados para la especie. Además, según Thomas et al. (2004), debe tenerse en cuenta que la capacidad de las especies para establecerse en nuevas áreas climáticamente adecuadas se verá limitada por la pérdida o fragmentación del hábitat, y su capacidad para permanecer en climas adecuados se verá afectada por nuevas interacciones.

Finalmente, para establecer el riesgo de extinción y evaluar la aptitud adaptativa de esta especie, se requieren estudios de genética poblacional para determinar la sostenibilidad y resiliencia genómica. Actualmente se están realizando estudios citogenéticos para evaluar la ploidía de las diferentes poblaciones y verificar si existe una relación con la distribución geográfica (Peralta et al., no publicado).

Conclusiones

- Este es el primer estudio para determinar la situación de *Hedeoma multiflora* frente al cambio climático, estimar su estado de vulnerabilidad y conocer la extensión del área de distribución. Esto permitirá monitorear y evaluar las poblaciones actuales que podrían desaparecer, proponer áreas naturales protegidas y contribuir a la elaboración de planes de protección *in situ* y *ex situ*.
- Se podría orientar la recolección sostenible de este germoplasma para mejorar la efectividad de su conservación. Es muy probable que la mayoría de los impactos del cambio climático sean el resultado de interacciones entre diferentes amenazas. Además, la capacidad de esta especie para colonizar nuevas áreas estará condicionada por la pérdida y fragmentación de su hábitat. Según el modelo, las proyecciones para el futuro bajo un escenario de cambio climático muestran que la distribución geográfica se mantendrá relativamente estable. Las variables que más influyen en esta especie son el rango de temperatura anual, precipitación del trimestre más cálido, isothermalidad y Pendiente.
- Estas nuevas áreas podrían utilizarse para el establecimiento de cultivos controlados que permitan disminuir la presión en poblaciones naturales.
- Con respecto al estado de vulnerabilidad, no hay suficiente evidencia para considerar a esta especie como vulnerable porque no presenta una distribución fragmentada. Pero *in situ* puede percibirse la situación contraria debido a las actividades humanas.
- Las áreas de alta idoneidad previstas concuerdan con regiones altamente modificadas por actividades humanas.

Capítulo 3: Propuesta de acciones para su conservación *ex situ* mediante cultivo de tejidos vegetales y caracterización de las semillas.

Marco teórico

Una estrategia para la propagación y conservación de *H. multiflora* es el uso de biotecnologías sencillas como el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, colaborando en el mantenimiento de una producción regular, en la producción de mayor biomasa y semillas para repoblar regiones vulnerables. En la actualidad ha aumentado el interés por parte de las industrias en desarrollar métodos de producción en donde la calidad, cantidad y costos no se vean influenciados por las condiciones edafoclimáticas regionales ni por regulaciones sanitarias.

La biotecnología vegetal es el estudio de distintas metodologías para utilizar a las plantas, sus partes o sus productos. Según Rocha (2004), es un grupo de técnicas propias de varias disciplinas (genética, fisiología, bioquímica, etc.), que explotan algunos procesos biológicos para crear productos útiles. Dentro de la biotecnología vegetal, se considera el desarrollo de biorreactores, transformación genética y el cultivo de tejidos, entre otras.

La micropropagación consiste en el cultivo de plantas en un ambiente artificial controlado, utilizando un medio de cultivo adecuado para esa especie (Olmos et al., 2010). Gracias a la propiedad de regenerar una planta completa y funcional ante estímulos adecuados, células somáticas puede formar distintos órganos.

La propagación vegetativa puede realizarse de dos maneras:

- Por macropropagación: conjunto de operaciones sencillas, desde multiplicación por esquejes, acodos, etc.

- Por micropropagación: operaciones basadas en el cultivo de tejidos vegetales, que permiten la propagación masiva de plantas genéticamente iguales o modificadas y libres de patógenos. Esta metodología se basa en que un fragmento vegetal aislado (explanto) se cultiva en un ambiente estéril, sobre en un medio de cultivo nutritivo, con una composición química definida, bajo condiciones ambientales controladas. Cada explanto origina una planta nueva gracias a dos características de la célula vegetal: la capacidad para regenerar una planta completa (totipotencia) y la capacidad de retención para volver al estado meristemático (desdiferenciación). Luego de la multiplicación, debe establecerse el posterior enraizamiento *in vitro* de brotes. Esta técnica es muy difundida y puede utilizarse para mejorar y reemplazar al sistema tradicional de cultivos. Por lo tanto, cualquier tejido en un medio que reúna las condiciones químicas apropiadas podrá ser estimulada a sintetizar sustancias particulares de la planta madre (Olmos et al., 2010).

Ventajas del cultivo *in vitro*:

- Una producción regular para abastecer las exigencias del mercado.
- Pueden obtenerse metabolitos secundarios en condiciones controladas, independientemente de factores bióticos (interacción con patógenos y predadores) y abióticos (sequía, temperaturas extremas, radiación UV, etc.)
- Aumento en el rendimiento para la obtención de metabolitos.
- Obtención de nuevos metabolitos secundarios, producto de la manipulación de las condiciones de cultivo, con un mayor potencial farmacológico.
- Reducción de costos si se automatiza el proceso.
- Posibilidad de realizar controles de calidad más estrictos.
- Pueden garantizarse grandes volúmenes de biomasa de alta calidad en menor tiempo.

Las ventajas de la micropropagación son:

- Multiplicación acelerada del número de plantas.
- Mayor control sanitario.
- Multiplicación de grandes cantidades de plantas en espacios reducidos.

Las respuestas de una especie al cultivo *in vitro* y el posterior éxito del cultivo dependen de varios factores, entre ellos, la metodología, longitud de la luz, temperatura, tipos de contenedores, tipo de cubiertas, la consistencia del medio de cultivo, tipo de reguladores de crecimiento y el genotipo empleado.

La micropropagación en esta especie, fue evaluada por varios investigadores que utilizaron diferentes medios de cultivo, diluciones y concentraciones de reguladores de crecimiento. Brunetti et al. (2007) y Pedranzani et al. (2002) informaron una mayor elongación del eje principal en el establecimiento *in vitro* y un alto porcentaje en la supervivencia, cuando se usa medio MS (Murashige & Skoog, 1962) diluido, independientemente de la concentración de 6, bencilaminopurina (BAP). Por otro lado, con el fin de evaluar la tasa de multiplicación y generación de raíces en esta especie, diferentes autores realizaron pruebas en medio MS (completo y a media concentración) suplementado con reguladores de crecimiento (Koroch et al. 1997; Peralta et al. 2016, 2017; Díaz Gabutti et al., 2018). En cuanto al tamaño del explanto, Pedranzani et al. (2002) informaron que, a partir de explantos uninodales, se lograron plantas vigorosas, sin clorosis, a una temperatura de 20 ± 2 ° C, con una longitud promedio de 10 cm de altura.

Es necesaria la conservación *ex situ* del germoplasma nativo en riesgo e incorporarlo a programas de protección vegetal. La misma problemática también se observa en otras poblaciones de PAMs como *Minthostachys verticillata*, *Achyrocline satureoides*, *Passiflora caerulea*, *Acantholippia seriphioides*, *Lippia turbinata* y *Baccharis crispa*. Elechosa y Juárez (2003) agregan a esta lista a *Minthostachys mollis*, *Lippia integrifolia*, *Baccharis articulata*, *Baccharis trimera*, *Satureja odora*, *Satureja parvifolia*, *Aloysia citriodora*, *Aloysia gratissima* y *Aloysia polystachya*.

Objetivo

Elaborar protocolos *in vitro* para la multiplicación por cultivo de tejidos y para su incorporación en un plan de conservación en un banco *in vitro*.

Iniciar la caracterización de las semillas para su incorporación en un banco de germoplasma.

Materiales y Métodos

- *Propagación de estacas in vivo*

A partir de un lote de semillas silvestres procedente de la provincia de San Luis, se obtuvieron plantines, de los cuales se seleccionó uno que presentó mayor vigor de crecimiento y una mejor apariencia, por lo que fue seleccionado como planta madre para su multiplicación. Se conformó un stock de clones, con el propósito de obtener los explantos para la propagación *in vitro*.

Para la macropropagación, se cortaron esquejes herbáceos binodales de aproximadamente 2,5 cm de largo y el extremo basal fue impregnado con ácido indol-3-butírico (IBA) 3000 ppm en talco para estimular el enraizamiento. Se distribuyeron 5 esquejes por maceta de 10 cm de diámetro (20 esquejes en total) con sustrato comercial de enraizamiento Tabaco de Grow Mix® humedecido (humedad 55-65%; pH 5,00–5,70; densidad sustrato seco: 130-150 Kg/m³; porosidad Total: 90-95%). Todas las macetas se cubrieron con bolsas de nylon transparentes para crear el efecto de cámara húmeda. Los esquejes se cultivaron bajo condiciones de invernáculo estándar, con irradiancia de luz natural.

Con el objetivo de permitir el intercambio gaseoso y de reducir la humedad en forma paulatina, cada 48 horas se realizaron pequeños tajos en las bolsas hasta

no observar condensación en su interior. Luego de 15 días los esquejes enraizados fueron trasladados a macetas individuales, con sustrato específico de trasplante y repique Grow Mix® (humedad 55-60%; pH 5,40–5,90; densidad sustrato seco: 200-240 Kg/m³; porosidad Total: 85-90%) y cultivados en las mismas condiciones de invernáculo estándar.

- *Micropropagación in vitro*

Los datos obtenidos en los diferentes pasos, se analizaron estadísticamente por ANOVA y comparación de medias a través del test de Tukey al 5% de significancia.

Desinfección

Los clones que se utilizaron como plantas madres fueron pretratados con una solución antifúngica de Carbendazim 0,5 g/l (Mamboretá®) en forma semanal, durante 21 días.

Para la introducción *in vitro*, se tomaron como explantos segmentos binodales que fueron desinfectados en forma superficial mediante inmersión y agitación suave en una solución de hipoclorito de sodio (1,2 % de Cl⁻ activo) por 15 minutos. Inmediatamente y bajo condiciones de flujo laminar, los explantos fueron lavados tres veces con agua destilada estéril. Se realizaron dos introducciones (dos repeticiones) con un n=20 c/u, con una diferencia de tres días.

Introducción y establecimiento para multiplicación

En la introducción del material *in vitro* se probaron dos concentraciones de medio de cultivo para evaluar la respuesta de los brotes (número de brotes, vigor, longitud). El medio basal semisólido MS completo (MS 1X) y el mismo medio con sus macro y micro nutrientes diluidos a la mitad (MS 0,5X). Ambos tratamientos suplementados con 20 g/l de sacarosa y 7 g/l de agar y libres de reguladores de

crecimiento. El pH se ajustó a 5,8 con KOH. Para cada tratamiento (MS 1X y MS 0,5X) se sembraron 10 segmentos binodales en sendos tubos de 110x25 mm, conteniendo 10 ml de medio, tapados con tapones de algodón autoclavados. Se cultivaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura y 16:8 h de fotoperíodo ($115 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$), durante 45 días realizando un repique cada 15 días. El procedimiento anterior se repitió otra vez a los tres días, con nuevos explantos provenientes de la misma planta madre, para obtener dos repeticiones para cada tratamiento.

Introducción y establecimiento para conservación

Se utilizó medio basal semisólido MS con sus macro y micro nutrientes diluidos a la mitad (MS 0,5X), suplementado con 20 g/l de sacarosa y 7 g/l de agar y libres de reguladores de crecimiento. El pH se ajustó a 5,8 con KOH. Se sembraron 10 segmentos binodales en tubos de 110x25 mm, conteniendo 10 ml de medio, tapados con tapones de algodón autoclavados. Se cultivaron a $19 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura y 16:8 h de fotoperíodo ($115 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$), durante 90 días realizando un repique cada 45 días.

Multiplicación

Los explantos cultivados en MS 1X fueron transferidos al mismo medio base, pero suplementado con diferentes concentraciones de la citocinina 6-bencilaminopurina (BAP): 0,0; 2,2; 4,4; 8,8; 17,7 y 22,2 μM para generar multibrotación. Se cultivaron 10 explantos por cada tratamiento, con dos repeticiones, siguiendo un diseño experimental aleatorizado.

Enraizamiento

Se transfirieron veinte segmentos binodales de aproximadamente 1,5 cm de longitud, provenientes de cada uno de los tratamientos con BAP a un medio MS (1X) con y sin el agregado de 2,4 μM ácido indol-3-butírico (IBA) para promover el enraizamiento, bajo las mismas condiciones de cultivo descriptas anteriormente.

Aclimatación

Las raíces de las plántulas se lavaron con abundante agua para retirar remanentes de agar adherido. Luego se sumergieron por 10 segundos en agitación suave, en una solución con fungicida Carbendazim 0,5 g/l (Mamboretá®). Posteriormente las plántulas fueron transferidas a bandejas de germinación de 50 alvéolos conteniendo un sustrato de transplante y repique de Grow Mix® estéril: perlita (1:1) y cubiertas con nylon transparente a manera de cámara húmeda. Los primeros 10 días, permanecieron en la sala de cultivo, para una aclimatación moderada, luego se trasladaron al invernáculo por 10 días más. Pasado el período de 20 días en bandejas de germinación, las plántulas se transfirieron a macetas individuales de 10 cm de diámetro con el mismo sustrato de transplante Grow Mix®. Se mantuvieron bajo condiciones de invernáculo estándar, con luz natural, durante 60 días más.

Transferencia a campo

Se transfirieron a campo 48 plantas *ex vitro* de 120 días, procedentes de los tratamientos con y sin IBA (24 plantas por tratamiento) con el objetivo de observar si el agregado de diferentes concentraciones de hormonas produce cambios en el crecimiento, rendimiento y floración. La implantación se realizó a una distancia de 25 cm entre plantas dentro del surco (8 plantas) y 50 cm entre surco, intercalando los tratamientos (un tratamiento por surco). Para los bordes se utilizaron plantas control. Se aplicó riego manual según requerimientos y se realizó el desmalezado en forma manual. Periódicamente se midió el diámetro y la altura de la mata (Anexo 4).

Producción de biomasa

A cosecha (postfloración) se estimó la producción de biomasa aérea en bulk, para cada tratamiento, por pesada del material fresco y material oreado.

Rendimiento de aceite esencial

Los aceites esenciales de los tratamientos con y sin IBA se obtuvieron por el método de hidrodestilación (Anexo 5) a partir de material vegetal oreado, utilizando una trampa Clevenger aproximadamente por 2 horas, según Van Baren et al. (2010). Se analizaron las partes aéreas de 20 plantas en batch de cada tratamiento.

Evaluación de semillas silvestres y ex vitro

Para el análisis exomorfológico (longitud, ancho, simetría, color, aspecto de la superficie y longitud hilo-micropilar) las semillas fueron fotografiadas bajo la lupa y analizadas con software ImageJ®. Los datos se analizaron con ANOVA y prueba de Tukey. Para ambos grupos, se calculó el P1000 y el poder germinativo (PG) durante 10 días en material sin escarificar, con 4 repeticiones de 50 semillas equidistantes por caja de Petri, sobre papel secante húmedo (T: 25°C ± 1 FP: 16:8h).

Resultados

En la propagación de clones *in vivo* se obtuvo un 80% de eficiencia en el enraizamiento de los esquejes y un 70% de supervivencia a 30 días de iniciado el proceso. Este material sirvió como fuente de explantos para los posteriores ensayos de micropropagación.

El protocolo de desinfección de los explantos resultó ser adecuado y no se observó ningún tipo de contaminación endógena. El 100 % sobrevivió al procedimiento y pudo establecerse bajo condiciones *in vitro*.

En la introducción *in vitro* de *H. multiflora* no se observaron diferencias en la longitud de los brotes entre las concentraciones de medio de cultivo probadas, pero si en la cantidad de brotes (MS 1X $4,43 \pm 0,46$; MS 0,5 $5,86 \pm 0,46$ (Test de Tukey, $p < 0,05$)). Sin embargo, los brotes desarrollados en MS 1X presentaron un mejor aspecto (color y turgencia), por lo tanto, se seleccionó este tratamiento para continuar con los ensayos.

Todos los tratamientos con BAP (que estimula la generación de brotes) produjeron multibrotaciones a partir de callos de color verde y aspecto nodular, excepto el de menor concentración que sólo presentó ensanchamiento de la base del explanto. La Figura 11 muestra diferentes etapas del desarrollo del cultivo *in vitro* de *H. multiflora*.

Con respecto al protocolo de conservación, los explantos sobrevivieron sin inconvenientes, estimándose que se puede alargar el tiempo de repique si se incorporan 5 ml más de medio de cultivo.



Figura 11: segmento binodal cultivado en medio MS suplementado con BAP (a); conjunto de brotes originados *de novo* a partir de un callo de 45 días en el mismo medio (b); Brotes aislados luego de 60 días de iniciado el cultivo (c). Aclimatación de esquejes (d).

En la Tabla 2 se muestran las tasas de multiplicación (n° de brotes en buen estado/explanto) en las diferentes concentraciones de BAP evaluadas luego de 45 días de cultivo. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, excepto con el control.

BAP (μM)	Tasa de multiplicación (nro. Brotes/explanto)
0	2,25 \pm (0,14) a
2,2	7,05 \pm (1,14) b
4,4	6,45 \pm (1,06) b
8,8	7,80 \pm (1,48) b
17,7	8,60 \pm (0,95) b
22,2	8,20 \pm (1,17) b

Tabla 2. Número de brotes/explanto a 45 días de cultivo, obtenido en las diferentes concentraciones de BAP aplicadas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Test de Tukey, $p < 0,05$). En negrita se resalta el tratamiento seleccionado para la multiplicación *in vitro*.

La eficiencia de enraizamiento fue del 100% en los tratamientos probados y la supervivencia a los 45 días fue del 90% en todos los tratamientos. La Tabla 3

compara los promedios de las longitudes y del número de raíces desarrolladas en cada brote, según los tratamientos con y sin IBA (auxina), en los diferentes tratamientos con BAP. Se observó que los explantos repicados a un medio con IBA desarrollaron raíces de menor longitud (de 9,15 a 28,10 mm) que aquellos que no fueron tratados con IBA (29,76 a 63,20 mm). También, en un medio con IBA, se observó que los brotes provenientes de tratamientos con BAP presentaron una disminución en el número de raíces (desde 4 a 8 cuando fueron tratadas con BAP y 10 sin BAP). Con respecto al ancho, las raíces sin IBA fueron más angostas ($0,34 \pm 0,5$ mm) que las tratadas con IBA ($0,74 \pm 0,5$ mm). Además, poseen una tonalidad más clara respecto de las raíces desarrolladas en los tratamientos conteniendo la auxina (Fig. 12).

Tabla 3. Número y longitud promedio de las raíces adventicias desarrolladas en brotes provenientes de los tratamientos con BAP, transferidos a medio base MS (1X) con y sin suplementación de 2,4 μ M IBA. En negrita se muestran las mejores respuestas. Medias con una letra común no son significativamente diferentes según Tukey ($p > 0,05$). $n=50$.

BAP (μ M)	Longitud de la raíz (mm)		Número de raíces	
	Sin IBA	Con IBA	Sin IBA	Con IBA
0	63,20 \pm (2,83) a	17,63 \pm (2,52) ab	7,00 \pm (0,54) a	10,00 \pm (0,94) a
2,2	62,30 \pm (3,38) a	18,44 \pm (3,44) ab	6,78 \pm (0,36) a	6,33 \pm (0,75) bc
4,4	52,86 \pm (7,76) ab	28,10 \pm (3,37) b	6,90 \pm (0,82) a	8,40 \pm (0,45) b
8,8	49,63 \pm (8,21) ab	9,15 \pm (2,21) a	4,50 \pm (0,73) a	4,20 \pm (0,65) c
17,7	29,76 \pm (5,17) b	19,87 \pm (3,70) ab	6,70 \pm (0,96) a	5,00 \pm (0,63) c
22,2	32,62 \pm (5,98) b	9,58 \pm (1,55) ab	5,40 \pm (0,48) a	5,30 \pm (0,54) c



Figura 12: se observan las diferencias morfológicas de las raíces inducidas en brotes de *H. multiflora* cultivados en un medio con o sin el agregado de 2,4 μM de IBA, previo a la aclimatación. Coloración (a) y longitud (b)

La mezcla de Grow Mix® estéril:perlita (1:1) ensayada previamente (datos no mostrados) resultó adecuada como sustrato de enraizamiento para esta especie (Fig. 13). El 100% de las plántulas prosperaron satisfactoriamente.



Figura 13. Plantines *ex vitro* de 60 días aclimatados bajo condiciones de invernáculo

El ensayo en el campo experimental se llevó a cabo durante dos años y medio, donde se practicaron dos cosechas anuales sólo en el primer año (Diciembre y Marzo) con una supervivencia del 90%. Todas las plantas *ex vitro* se adaptaron al ambiente del predio experimental y mostraron un aumento del diámetro de la mata durante el periodo vegetativo. Si bien la altura de la mata disminuyó con el tiempo, esto se debe a que los tallos presentaron un hábito de crecimiento decumbente (Fig. 14). Al momento de la cosecha las plantas presentaron una altura entre 17 y 24 cm. en promedio. No se observaron diferencias en el crecimiento entre los tratamientos.

A 2 meses de la implantación (plantas de 5 meses) todos los individuos florecieron en forma uniforme y luego semillaron (Figura 15).

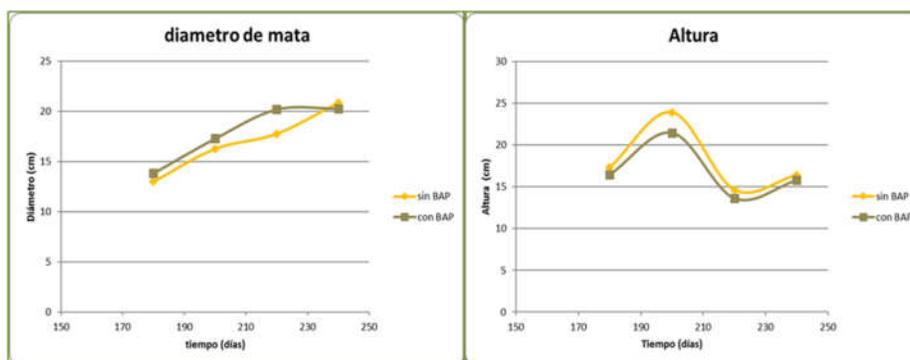


Figura 14: Diámetro y altura de la mata durante el período vegetativo. En el tratamiento control se registró mayor diámetro de mata que las plantas multiplicadas con BAP (18,42 vs. 16,47 respectivamente) (Tukey, $p < 0,05$). No se observaron diferencias significativas en la altura.



Figura 15. Plantas *ex vitro* en la parcela experimental. Vista general de la parcela (a). Vista ampliada de un surco (b). Planta en período vegetativo a 30 días de la implantación (c). Planta en período de floración a 60 días de la implantación (d).

Con respecto a las semillas, tienen forma ovoide, ápice redondeado y base aguda, levemente asimétrica, de color marrón oscuro y superficie areolada (Fig. 16). Las mediciones entre semillas de plantas tratadas con BAP y el control, no presentaron diferencias significativas en el P1000 ($0,013 \pm 0,0004g$), PG (60%),

el hilo basal ($0,15 \pm 0,02\text{mm}$), el espesor del tegumento ($0,049 \pm 0,003\text{mm}$) y la longitud ($1,30 \pm 0,06\text{mm}$). Reacción de mixocarpia fuerte. Si existen diferencias en el ancho, en donde la población silvestre presenta un valor menor ($0,56 \pm 0,01\text{mm}$) que las obtenidas en la cosecha de la población *ex vitro* ($0,60 \pm 0,01\text{mm}$).

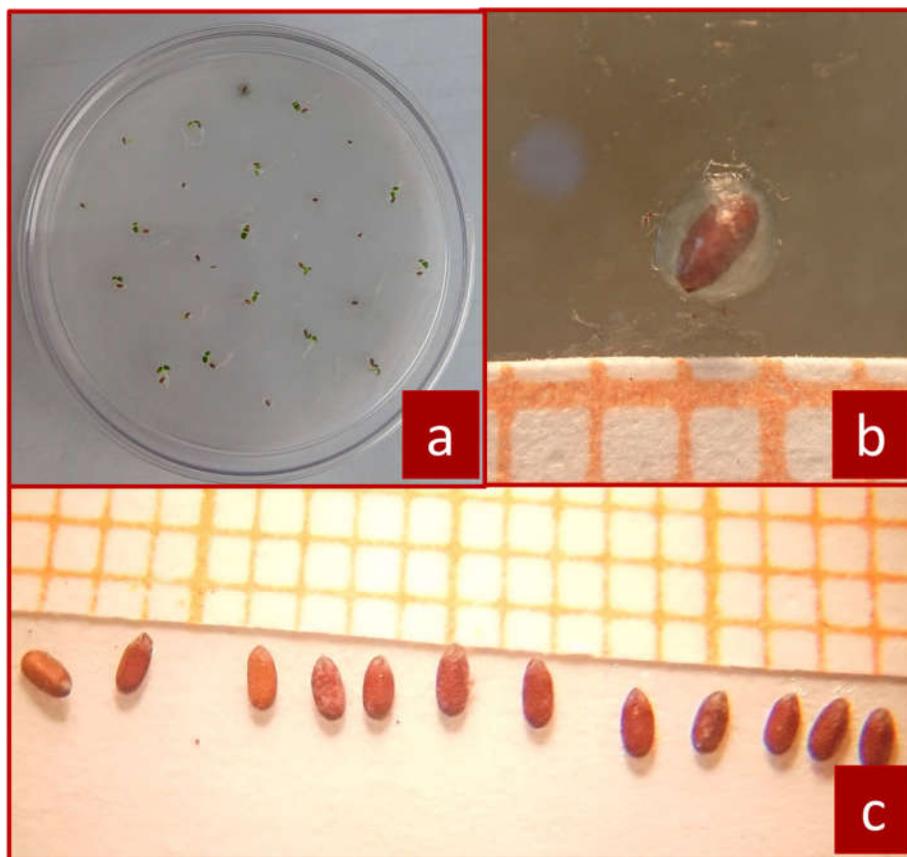


Figura 16: Caracterización de semillas de *H. multiflora*. Evaluación del PG (a). Reacción de mixocarpia (b). Tamaño (c).

No se observaron diferencias significativas en la producción de biomasa de la parte aérea de plantas tratadas y no tratadas con BAP, siendo de $1,77 \pm 0,64$ g peso fresco y $1,13 \pm 0,63$ g peso oreado, en promedio. Por último, las plantas control y las tratadas con BAP presentaron un porcentaje en aceite esencial de 0,46 % y 0,57% respectivamente.

Discusión

El desarrollo de los protocolos fue satisfactorio. Se evaluó a un único clon a fin de ajustar dicho procedimiento y cerrar el ciclo de propagación, que puede ser aplicado a un ejemplar con características de interés en el futuro.

Los valores de la tasa de multiplicación, no presentaron diferencias significativas entre tratamientos, excepto con el control, por lo que se tomó el tratamiento de menor concentración de citocinina ($2,2 \mu\text{M}$) para continuar con los ensayos y disminuir los costos. Este valor de multiplicación de $7,05 \pm (1,14)$ es similar al reportado por Koroch et al. (1997), quienes utilizaron MS 0.5X con $22.20 \mu\text{M}$ de BAP, y también, un poco superior al obtenido por Díaz Gabutti et al. (2018), quienes utilizaron diferentes combinaciones de ácido naftalenacético (ANA) y BAP. Sin embargo, en resultados anteriores reportados por la misma autora (Díaz Gabutti et al., 2016), las plantas se mantuvieron más tiempo en fase de establecimiento, y al alargar el tiempo de subcultivo obtuvieron hasta 32.5 brotes por explanto. Este resultado es similar al obtenido en ensayos previos (datos no mostrados), aunque el material en esas condiciones presentó vitrificación y no sobrevivieron al proceso de enraizamiento. Se destaca que tanto en este trabajo como en el de Díaz Gabutti et al (2018), aunque se utilizaron diferentes reguladores, no se observaron diferencias significativas para el número de brotes. También la organogénesis resultó indirecta en alguno de los tratamientos, dado por la concentración de citocinina. En este trabajo, fue evidente que la concentración de BAP es proporcional a la formación de callos, el valor más bajo fue suficiente para generar muchos brotes en un explanto más elongado, sin necesariamente pasar por la formación de un callo.

Con respecto a las raíces, se registró una disminución en la longitud de las raíces a medida que se incrementa la concentración de BAP, lo que podría atribuirse a efectos residuales de la citocinina en el brote. También se observó que sobre el medio base probado (MS 1X), la concentración de IBA evaluada no favoreció la elongación de raíces adventicias. Son muy evidentes las diferencias que se

observan en la longitud de las raíces con y sin el agregado de IBA, independientemente del tratamiento de BAP de origen. Estos resultados sobre la longitud de las raíces coinciden con los reportados para *Nothofagus glauca* por Uribe et al. (2012) y para *Ugni molinae* por Rodríguez Beraud et al. (2015). No obstante, a pesar de las diferencias observadas (longitud, diámetro, desarrollo de pelos adsorbentes, color) la aclimatación, la posterior implantación, y el comportamiento a campo confirma la funcionalidad de las raíces adventicias desarrolladas en todos los tratamientos. Según estos resultados, no es necesario el aporte extra de auxinas (IBA) para el desarrollo radicular *in vitro*, y con bajas concentraciones de citocinina (BAP) es suficiente para la generación de multibrotación. Esto permite trabajar con un protocolo más económico si se tiene en cuenta que el medio MS 1X sólo fue seleccionado por el aspecto del explanto, pero que no registró diferencia en la introducción cuando se evaluó el MS a la mitad.

La aclimatación resultó efectiva, la supervivencia fue superior al 20% reportado por Díaz Gabutti et al. (2018) después de la quinta semana de supervivencia, siendo del 90% en nuestro ensayo. Además, el 90 % de las plántulas implantadas cumplieron su ciclo de vida en los dos años y medio de evaluación a campo.

Vale destacar que, si bien las plantas a campo se adaptaron muy bien, el espacio entre ellas resultó muy amplio, por lo que se ajustará el marco de implantación para futuros ensayos.

Finalmente, los resultados al comparar las semillas silvestres con las obtenidas de las plantas *ex vitro*, muestran que pueden utilizarse para la siembra, sin importar la metodología ni el origen de las plantas madres. Esto garantiza su reproducción y la supervivencia de plantines destinados a su domesticación y aporta a proyectos de conservación para este recurso. Con respecto al PG obtenido, es un poco inferior al 72% reportado por Suárez et al. (2000), aunque las condiciones de temperatura fueron diferentes. En dicho ensayo, fue de 30°C en los períodos de luz y de 20°C en oscuridad y se evaluaron por 18 días. En

cuanto a la diferencia en el ancho de las semillas, puede deberse a que las plantas cultivadas en el ensayo, tuvieron riego, por lo tanto, mayor cantidad de reserva.

Conclusiones

- Se completó eficazmente tanto el ciclo de propagación *in vivo* como *ex vitro* de *H. multiflora*.
- El protocolo de conservación resultó apropiado y con las características evaluadas, estaría en condiciones de incorporarla en un banco *in vitro* y posterior reintroducción en su ambiente natural.
- La organogénesis observada fue de naturaleza indirecta, a través de un callo, por lo que el protocolo de propagación aplicado podría llegar a ser fuente de variabilidad si se incrementa la concentración de citocinina. Este procedimiento podría aprovecharse para restaurar su ambiente dañado, su conservación en bancos *in vitro* y para la producción y evaluación de metabolitos secundarios.
- A pesar de las diferencias observadas *in vitro*, las concentraciones de BAP o de IBA evaluadas no modificaron el crecimiento de las plantas a campo. Por lo tanto, la utilización de estas hormonas con el objetivo de aumentar la cantidad de plántulas a partir de un clon, resultó efectiva. No hay diferencias en el desempeño de las plantas tratadas, es decir, en su crecimiento, floración uniforme, producción de semillas, poder germinativo y rendimiento de aceites esenciales. Todas cumplieron un ciclo bianual.
- Se logró satisfactoriamente la implantación a campo de las plantas *ex vitro*, con un 90 % de supervivencia. Los datos obtenidos del cultivo inician el proceso para establecer un banco a campo.

- La biomasa puede incrementarse en menor tiempo con esta metodología y contribuir a la producción de aceites esenciales en mayor escala.
- El PG en las semillas silvestres y las obtenidas de plantas tratadas son muy similares, esto indica que, mediante la metodología propuesta, podría generarse en menor tiempo, una mayor cantidad, que abastezca bancos de germoplasma o a pequeños productores del sector de plantas aromáticas y medicinales.
- Los datos de las semillas permitirán establecer diferencias en las diferentes poblaciones. Además, se ha iniciado el proceso de evaluación del comportamiento de la semilla para su almacenaje y conservación en banco de germoplasma.

Conclusiones generales

La unión de varias disciplinas de la Biología y las Ciencias de la Tierra, los SIG, la disponibilidad de bases de datos de distribución de especies y el desarrollo de algoritmos, permiten la generación de modelos de predicción para determinar la distribución de las especies (Guisan & Zimmermann, 2000; Thomas et al., 2004).

Por primera vez se realizó una aproximación del estado de vulnerabilidad ambiental en esta especie mediante MNE. Los resultados sugieren que habría un aumento general en la idoneidad del hábitat para esta especie, pero estas áreas están altamente modificadas por diferentes actividades humanas como la ganadería, la agricultura, el aumento de los límites inmobiliarios, los incendios y la industria que podrían limitar la colonización y el establecimiento de *H. multiflora* en nuevos hábitats. Por otro lado, estas nuevas áreas podrían utilizarse para el establecimiento de cultivos controlados que permitan disminuir la presión en poblaciones naturales.

Paralelamente a la identificación de su estado de vulnerabilidad, es necesaria una propuesta de conservación para esta especie. Dentro de un contexto productivo, la biotecnología ha constituido una herramienta interesante para la agricultura y para diferentes industrias, y ha colaborado en la generación de bienes y servicios. Existen progresos en el desarrollo de protocolos de propagación *in vitro* en esta especie. Esto resulta una herramienta útil en programas de preservación y mejoramiento de este germoplasma nativo, debido a sus múltiples ventajas y, además, permite acortar el tiempo necesario para el desarrollo de nuevas variedades. Pero se necesita más investigación para desarrollar mejoras en diversidad, propagación, cultivo y mejoramiento genético, que permitan su producción de forma sustentable.

Para el protocolo de cultivo *in vitro* pudo ajustarse un protocolo de desinfección, introducción, propagación y aclimatación para la especie. Actualmente no hay registro de un protocolo de conservación, siendo el presentado en este trabajo

un pionero en esta especie. Esto es importante para la generación de un banco de cultivo para su conservación y posterior reintroducción en su ambiente natural.

Con respecto al protocolo de multiplicación, los valores obtenidos son prometedores, y coinciden con los resultados de otros investigadores que han hecho introducciones *in vitro* en esta especie utilizando otros medios de cultivo y otras combinaciones de hormonas (Koroch et al. 1997; Brunetti et al. 2007; Brunetti 2008). Este protocolo puede modificarse para las necesidades dentro de un banco de germoplasma, multiplicación clonal o generación de variabilidad.

Se estableció un protocolo de aclimatación y rusticación fundamentales para la regeneración de la plántula.

También se determinó el criterio para establecer un banco a campo para posible abastecimiento a pequeños productores.

Se definió un protocolo de germinación, indispensable para abordar su conservación en banco de germoplasma.

Se inició el protocolo de comportamiento de la semilla para establecer si es ortodoxa o recalcitrante.

Perspectivas

- La multiplicación *in vitro* permitirá incrementar la biomasa de esta especie en condiciones controladas y la comercialización de genotipos selectos. Bajo este aspecto, *H. multiflora* podría ser considerada para encarar estudios que incrementen su valor mediante estas técnicas, facilitando el proceso de introducción al cultivo y su domesticación. Esto aumentaría las alternativas de desarrollo en diferentes industrias. Podría certificarse la calidad uniforme de la cosecha requerida por las empresas que los utilicen en el ramo de la perfumería, cosmética, aromaterapia, farmacéutica, etc., con la obtención de material genético estable y garantizado. Dentro de la biocosmética, la inclusión de aceites esenciales, oleoresinas y extractos en la formulación de una fragancia, aumentan los atributos que le confieren una mayor cotización en el mercado de los perfumes.
- Este trabajo podría apoyar el desarrollo de pequeños productores en la introducción a cultivo de esta especie. Es necesario planificar propuestas responsables con el ambiente y con las comunidades, que valoricen los conocimientos de los recolectores, que tengan en cuenta el contexto social, que defiendan la identidad regional, es decir, una transformación sistémica de la región de acuerdo con los principios de desarrollo sustentable.
- Se espera terminar de establecer los datos y mediciones que se asocian a la identidad y posibilidad de uso de cada accesión (ej % de AE, su estabilidad según el clima, el suelo, etc.) datos agronómicos, morfológicos para poder definir el uso medicinal o uso aromático.
- Se espera lograr la reducción del impacto negativo que genera la sobreexplotación de esta especie nativa y colaborar en la reducción de su erosión genética.

- Se espera realizar la caracterización mediante marcadores moleculares de las poblaciones para comprobar la estabilidad genética de los ciclos de multiplicación y para su comparación con la planta madre.
- Finalmente, crear nexos con escuelas, ONGs y recolectores mediante talleres y cursos para difundir la importancia de reconocer las especies nativas de las diferentes regiones y la importancia de su conservación.

Anexos

Anexo 1 Fotografías de la toma de datos *in situ*



Población SL con flores



Población LP con frutos



Registro fotográfico



Entrevista a recolectora de San Luis



Hierbas aroándose bajo techo



Hierbas en el suelo, secándose al aire libre

Anexo 2 Fragmento entrevista a recolector

A los fines de hacer una interpretación teórica de la situación del sector, transcribimos la entrevista a un recolector de hierbas:

...“Y en esta dos carguitas debe haber cerca de los 30 kilos, porque he ido a buscar al hombro, no he ido a caballo. Cuando voy en el caballo traigo 80 kilos.

Nosotros nos ubicamos sobre un camino que tengo para ir, por el medio del campo, del campo de mi abuelo. Y de ahí, tenemos para ir, distintos senderos: dentro de la Quebrada del Ojo de Agua, para el lado de Bernardo Gallardo, para el Pantano Blanco, o La Loma del Peje.

De acá hay una hora y media a caballo, caminando hay un poco más... y después hay que dejar el caballo en el bajo, en el medio de la quebrada y tenemos que subir las laderas a juntar y recolectar todos los yuyos.

Por ejemplo, uno que no tiene sueldo, nos pagan 10 pesos, nos paguen 20... a mí me sirve, a nosotros nos pagan muy poco, pero el que lo compra, lo procesa, lo clasifica, le pagan más... el juntador... es el que menos gana, digamos.

Lo que me ha enseñado, he aprendido a trabajar y a respetarla y también lo más lindo, lo más importante que me ha dado es muy mucha salud y energía. Por cada lugar que paso, no me canso... No me cansa ir todo el día a la sierra... yo voy todos los días... El día que no voy es como que estoy incómodo. A veces uno no está bien, y una va para allá, para la tierra azul, para el comedero azul... y va para allá y uno vuelve re contento...no sé le cambea no sé... “

(Extraída del Documental en proceso del proyecto cinekinesis del taller de introducción a la realización audiovisual “Crónicas de oficios” de biblioteca popular de Travesía Pcia. de Córdoba sobre la historia de los yuyos y la vida de los recolectores en la localidad, 2017).

Anexo 3 Estudio del suelo



LABORATORIO del INSTITUTO DE SUELOS
Análisis Químico de Suelo



Muestra extraída por: **PATRICIA PERALTA**

N° de laboratorio	68704								
Identificación original									
SALINIDAD									
Conduc. eléc. mS/cm	mS . cm	0,31							
H2O de saturación	% v/p	41,2							
pH 1:2.5 agua	unid pH	8,07							
pH 1:2.5 CaCl2 0,01M	unid pH	7,38							
pH 1:2.5 KCL 1M	unid pH	7,19							
FERTILIDAD									
Materia Orgánica %	% p/p	2,09							
Carbono Orgánico %	% p/p	1,21							
Nitrógeno Orgánico %	% p/p	0,11							
Relación C/N	s/u	11,0							
Fósforo asimilable (Olsen)	mg/kg	17,2							
COMPLEJO DE INTERCAMBIO									
Calcio	cmol/kg								
Magnesio	cmol/kg	2,1							
Sodio	cmol/kg	0,8							
Potasio	cmol/kg	0,9							
Suma cationes (S)	cmol/kg								
CIC (I)	cmol/kg	12,9							
Saturación (V)	%								
PSI	%	6,2							
CaCO3	%	***							

Anexo 4 Fotografías del trabajo *in vitro*



Explantos iniciales en MS+BAP



Multiplicación a partir de callo



Brotos originados de un callo, colocados en los diferentes tratamientos



Acimatación de plántulas en sala de cultivo, previo a la implantación a campo



Trabajo de mantenimiento de plántulas en invernáculo



Implantación en el campo experimental del IRB, INTA Castelar

Anexo 5 Hidrodestilación

Fragmento tomado de “Farmacopea Argentina Septima edición” (2017).

La determinación de aceites esenciales en vegetales se lleva a cabo mediante extracción por arrastre con vapor de agua en un aparato apropiado en las condiciones que se detallan a continuación.

El aceite esencial es recolectado en un tubo graduado empleando xileno para fijarlo, mientras que el agua retorna al balón de extracción.

Aparato (ver Figura 1) - Consta de un balón con cuello corto esmerilado cuyo diámetro máximo interno es de 29 mm y de un condensado con junta esmerilada.

Las diferentes partes de este condensador están construidas en una sola pieza de vidrio de bajo coeficiente de expansión. El tapón K' tiene una abertura y el tubo K posee un orificio de 1 mm de diámetro, el cual coincide con la ubicación de la abertura del tapón. El extremo final del tubo K es esmerilado y tiene un diámetro interno de 10 mm; un tubo en forma de pera J de 3 ml de capacidad; un tubo JL graduado en 0,01 ml; un tubo en forma de bulbo de aproximadamente 2 ml de capacidad y una válvula de tres vías M. La unión B se encuentra a 20 mm de la graduación máxima superior.

El aparato posee un dispositivo apropiado para ser calentado.

Procedimiento - Llevar a cabo el ensayo de acuerdo con la naturaleza de la droga a ser examinada. Transferir al balón el volumen de líquido indicado en la monografía correspondiente, agregar algunos trozos de plato poroso y colocar el condensador. Introducir agua a través del tubo de llenado N hasta el nivel B. Quitar el tapón K' y transferir la cantidad indicada de xileno empleando una pipeta con su extremo en la parte inferior del tubo K. Colocar el tapón K' asegurándose que los orificios de K y K' coincidan entre sí. Calentar el líquido en el balón hasta

ebullición y ajustar la velocidad de extracción a aproximadamente 2 ml por minuto, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente.

Para determinar la velocidad de extracción, disminuir el nivel de agua por medio de la válvula de tres vías hasta que el menisco se encuentre en la marca inferior a (ver Figura 2). Cerrar la válvula y medir el tiempo que toma el líquido en alcanzar la marca superior b. Abrir la válvula y continuar con la extracción, modificando el calentamiento para regular la velocidad de extracción. Extraer durante 30 minutos. Detener el calentamiento y leer el volumen de xileno en el tubo graduado después de por lo menos 10 minutos.

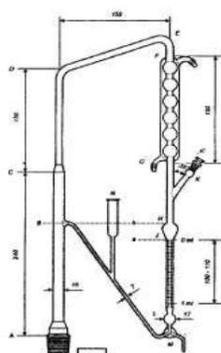


Figura 1. Aparato para la determinación de aceites esenciales en drogas vegetales (las dimensiones son mm).

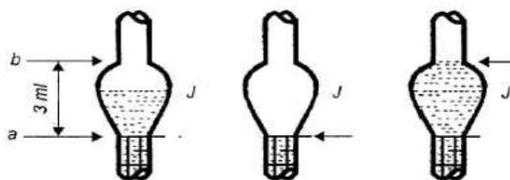
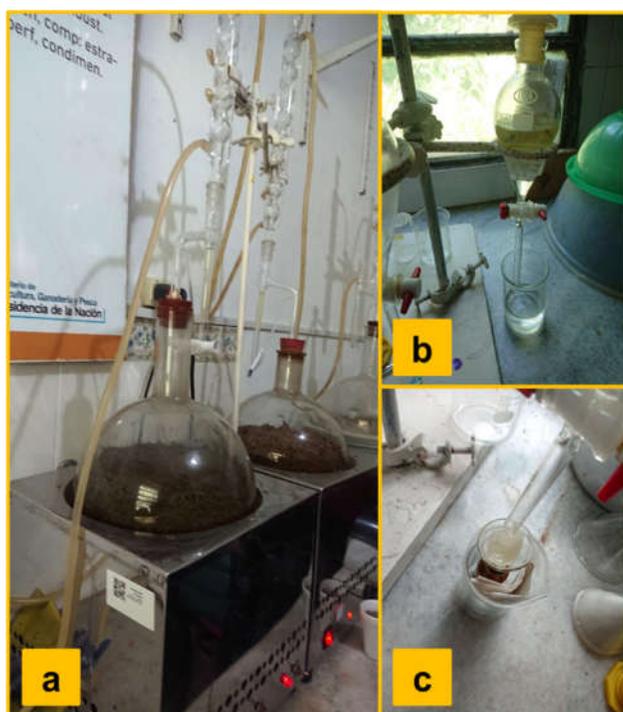
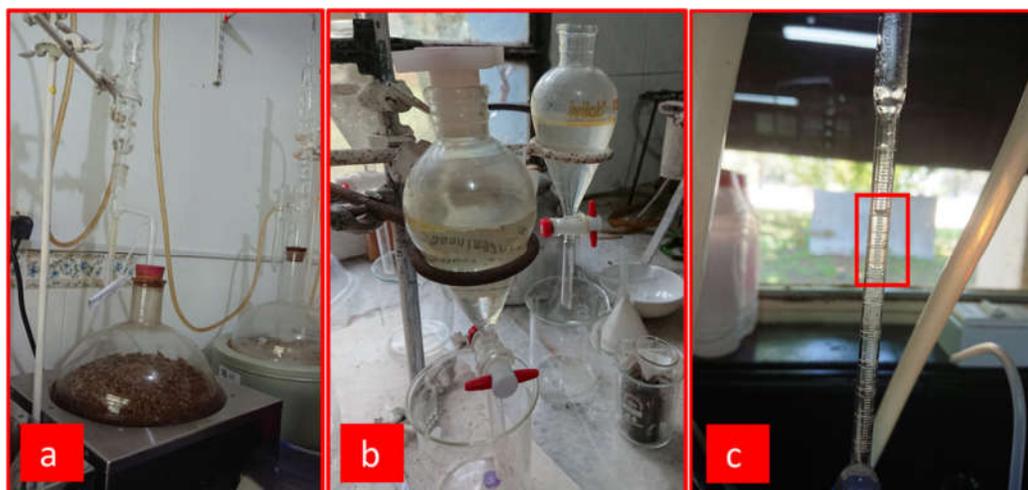


Figura 2.

Transferir el balón la cantidad de muestra especificada en la monografía correspondiente y continuar la extracción como se ha descrito anteriormente en tiempo y velocidad según se indique. Detener el calentamiento y después de 10 minutos leer el volumen de líquido recolectado en el tubo graduado y restarle el volumen de xileno anteriormente medido. Calcular el resultado en ml por cada 100 g de droga.



Balones cargados con material vegetal, sobre manto eléctrico (a), decantación en ampolla (b) y filtrado (c)



Vista general del equipo de hidrodestilación (a), separación de la fase volátil de la no volátil (b) y AE marcado dentro del recuadro (c).

Bibliografía

Citas y referencias bibliográficas en estilo APA 7° edición Norsk

- Ai, D., Gravel, D., Chu, C. & Wang, G. (2013). Spatial Structures of the Environment and of Dispersal Impact Species Distribution in Competitive Metacommunities. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068927>
- Alvarez, M. A. (2019). Pharmacological properties of native plants from Argentina. In *Pharmacological Properties of Native Plants from Argentina*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-20198-2>
- Anton, A. M. & Zuloaga, F. O. (2018). *Flora Vascular de la República Argentina. Eucotiledóneas: Lamiales* (F. O. Zuloaga & M. J. Belgrano (Eds.); Primer). Instituto de Botánica Darwinion.
- Arias Toledo, B., Trillo, C. & Grilli, M. (2010). Uso de plantas medicinales en relación al estado de conservación del bosque en Córdoba, Argentina. *Ecología Austral*, 20(3), 235–246.
- Austin, M. P. (1987). Models for the analysis of species' response to environmental gradients. *Vegetatio*, 69(1–3), 35–45. <https://doi.org/10.1007/BF00038685>
- Bachman, S., Moat, J., Hill, A. W., de la Torre, J. & Scott, B. (2011). Supporting red list threat assessments with GeoCAT: Geospatial conservation assessment tool. *ZooKeys*, 150(November), 117–126. <https://doi.org/10.3897/zookeys.150.2109>
- Barboza, G., Cantero, J., Núñez, C., Pacciaroni, A. & Ariza Espinar, L. (2009). Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*, 34(1–2), 7–365.
- Barros, V. R., Boninsegna, J. A., Camilloni, I. A., Chidiak, M., Magrín, G. O. & Rusticucci, M. (2015). Climate change in Argentina: trends, projections, impacts and adaptation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change*, 6(2), 151–169. <https://doi.org/10.1002/wcc.316>
- Beaumont, L. J., Hughes, L. & Poulsen, M. (2005). Predicting species distributions: Use of climatic parameters in BIOCLIM and its impact on predictions of species' current and future distributions. *Ecological Modelling*, 186(2), 251–270. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2005.01.030>
- Begon, M., Townsend, C. R. & Harper, J. L. (2006). Conditions. In *Ecology: from individuals to ecosystems* (Fourth, p. 753). Blackwell Publishing.
- Berkes, F. (1993). Traditional Ecological Knowledge in Perspective. In J. T. Inglis (Ed.), *Traditional ecological knowledge. Concepts and Cases* (pp. 1–10). https://doi.org/10.1007/978-3-030-22944-3_13
- Bocco, M., Montanari, N. & Vischi, N. (1993). Relevamiento de las plantas medicinales y/o aromáticas del Departamento de Río Cuarto (Córdoba) en relación a su explotación. *Anales de SAIPA*, 11, 217–225.
- Brereton, R., Bennett, S. & Mansergh, I. (1995). Enhanced greenhouse climate change and its potential effect on selected fauna of south-eastern Australia: A trend analysis. *Biological Conservation*, 72(3), 339–354. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(94\)00016-J](https://doi.org/10.1016/0006-3207(94)00016-J)
- Brunetti, P. C. (2008). *Propagación in vitro de Hedeoma multiflorum y composición de aceites esenciales*. Universidad Nacional de Córdoba.

- Brunetti, P. C., Ortiz, L., Palacio, L., Lloret, C., Goleniowski, M., (2007). Micropropagación de “tomillo de las sierras” *Hedeoma multiflorum* Benth. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas* Vol. 6 (6), 6(6), 390–414.
- Cabrera, A. L. (1971). Sociedad Argentina de Botánica. *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, XIV(1–2), 1–50.
- Cabrera, A. & Willink, A. (1973). *Biogeografía de America Latina*. (OEA (Ed.)).
- Chou, S. C., Lyra, A., Mourão, C., Dereczynski, C., Pilotto, I., Gomes, J., Bustamante, J., Tavares, P., Silva, A., Rodrigues, D., Campos, D., Chagas, D., Sueiro, G., Siqueira, G. & Marengo, J. (2014). Assessment of Climate Change over South America under RCP 4.5 and 8.5 Downscaling Scenarios. *American Journal of Climate Change*, 03(05), 512–527. <https://doi.org/10.4236/ajcc.2014.35043>
- Cingolani, A. M., Renison, D., Tecco, P. A., Gurchich, D. E. & Cabido, M. (2008). Predicting cover types in a mountain range with long evolutionary grazing history: a GIS approach. *Journal of Biogeography*, 35(3), 538–551. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2007.01807.x>
- Collins, M. & Knutti, R. (2013). Long-term climate change: Projections, commitments and irreversibility. In G.-K. Stocker, T.F., D. Qin & V. B. and P. M. M. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia (Eds.), *Climate Change 2013 the Physical Science Basis: Working Group I Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Vol. 9781107057, pp. 1029–1136). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.024>
- DeChaine, E. G., Forester, B. R., Schaefer, H. & Davis, C. C. (2013). Deep genetic divergence between disjunct refugia in the Arctic-alpine King’s Crown, *Rhodiola integrifolia* (Crassulaceae). *PLoS ONE*, 8(11), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079451>
- Del Vitto, Luis A.; Petenatti, E. M.; Petenatti, M. E. (1997). Herbal Resources of San Luis (Argentina). First Part: Native Plants. *Multequina*, 6, 6. <http://www.redalyc.org/html/428/42800606/>
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., González, L., Tablada, M. & Robledo, C. (2018). *Infostat* (No. 2012). Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.infostat.com.ar>
- Diaz Gabutti, M. S., Leporati, J., Terenti Romero, C., Ponce Arias, A. & Verdes, P. (2016). Establecimiento in vitro de *Hedeoma multiflora* Benth. *Dominguezia*, 32(2), 61.
- Díaz Gabutti, M. S., Leporati, J. & Verdes, P. (2018). Propagación in vitro de germoplasma nativo de *Hedeoma multiflora* Benth. vía organogénesis. *Biotecnología Vegetal*, 18(2), 105–110.
- Diniz-Filho, J. A. F., Mauricio Bini, L., Fernando Rangel, T., Loyola, R. D., Hof, C., Nogués-Bravo, D. & Araújo, M. B. (2009). Partitioning and mapping uncertainties in ensembles of forecasts of species turnover under climate change. *Ecography*, 32(6), 897–906. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2009.06196.x>
- Egoh B., Drakou E.G., Dunbar M.B., Maes J., L. W. L. (2012). Indicators for mapping ecosystem services: a review: JRC Scientific And Policy Reports. In *Proceedings of International Symposium on Effects of Impulse Noise on Hearing*. <https://doi.org/10.2788/41823>
- Elechosa, M. A., Aguirre, E., Bandoni, A. L., Di Leo Lira, P. M. R., Fernández, E. A., Heit, C., Juárez, M. A., López, S., Martínez, A. J., Martínez, E. , Marino, A. M., Molina, A. C., Molina, A. M., van Baren, C. M. & Vitorro, C. I. (2009). *Manual de recolección sustentable de plantas aromáticas nativas de la región central y noroeste de la Argentina* (Ediciones INTA (Ed.)). Ediciones INTA.

- Elechosa, M. A. & Juarez, M. A. (2003). Las plantas aromáticas y sus aceites esenciales. *IDIA*, 21(3), 60–69.
- Eleftheratos, K., Tselioudis, G., Zerefos, C., Nastos, P., Douvis, C. & Kapsomenakis, I. (2011). Observed and predicted climate changes in Uruguay and adjacent areas. *Hellenic Journal of Geosciences*, 45, 83–90.
- Elton, C. S. (1927). The Nature and Origin of Soil-Polygons in Spitsbergen. *Quarterly Journal of the Geological Society*, 83(1–5), 163–NP. <https://doi.org/10.1144/GSL.JGS.1927.083.01-05.07>
- Farmacopea Argentina Septima edición (7°)*. (2017). <https://doi.org/10.1177/0897190017699760>
- Fester, G. A., Martinuzzi, E. A., Retamar, J. A. & Ricciardi, A. I. (1961). *Aceites esenciales de la República Argentina* (Academia Nacional de Ciencias (Ed.)).
- Fielding, A. H. & Bell, J. F. (1997). A Review of Methods for the Assessment of Prediction Errors in Conservation Presence/absence Models. *Environmental Conservation*, 24(1), 38–49. <http://www.jstor.org/stable/44519240>.
- Forester, B. R., DeChaine, E. G. & Bunn, A. G. (2013). Integrating ensemble species distribution modelling and statistical phylogeography to inform projections of climate change impacts on species distributions. *Diversity and Distributions*, 19(12), 1480–1495. <https://doi.org/10.1111/ddi.12098>
- Galli, C. (2013). Los yuyeros del noreste de San Luis: actores sociales en torno a la recolección de plantas con usos aromáticos y/o medicinales. *V Congreso Argentino y Latinoamericano de Antropología Rural*, 55.
- Gavier, G. & Bucher, E. H. (2004). Deforestación de las sierras chicas de Córdoba (Argentina) en el período 1970–1997. *Academia Nacional de Ciencias de Córdoba*.
- Giorgis, M. A., Cingolani, A. M., Gurvich, D., Reyner, N. & Rufini, S. (2005). Diferencias en la estructura de la vegetación del sotobosque entre una plantación de *Pinus taeda* L. (Pinaceae) y un matorral serrano (Cuesta Blanca, Córdoba). *Kurtziana*, 31(1–2), 39–49.
- Goleniowski, M. E., Bongiovanni, G. A., Palacio, L., Nuñez, C. O. & Cantero, J. J. (2006). Medicinal plants from the “Sierra de Comechingones”, Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(3), 324–341. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.07.026>
- Grinnell, J. (1917). The Niche-Relationships of the California Thrasher. *The Auk*, 34(4), 427–433.
- Guisan, A. & Zimmermann, N. E. (2000). Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecological Modelling*, 135(2–3), 147–186. [https://doi.org/10.1016/S0304-3800\(00\)00354-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3800(00)00354-9)
- Hengl, T., De Jesus, J. M., Heuvelink, G. B. M., Gonzalez, M. R., Kilibarda, M., Blagotić, A., Shangguan, W., Wright, M. N., Geng, X., Bauer-Marschallinger, B., Guevara, M. A., Vargas, R., MacMillan, R. A., Batjes, N. H., Leenaars, J. G. B., Ribeiro, E., Wheeler, I., Mantel, S. & Kempen, B. (2017). SoilGrids250m: Global gridded soil information based on machine learning. In *PLoS ONE* (Vol. 12, Issue 2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169748>
- Hernandez, P. A., Graham, C. H., Master, L. L. & Albert, D. L. (2006). The effect of sample size and species characteristics on performance of different species distribution modeling methods. *Ecography*, 29(5), 773–785. <https://doi.org/10.1111/j.0906-7590.2006.04700.x>
- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G. & Jarvis, A. (2005). Very high

- resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25(15), 1965–1978. <https://doi.org/10.1002/joc.1276>
- Hossell, J. E., Ellis, N. E., Harley, M. J. & Hepburn, I. R. (2003). Climate change and nature conservation: Implications for policy and practice in Britain and Ireland. *Journal for Nature Conservation*, 11(1), 67–73. <https://doi.org/10.1078/1617-1381-00034>
- Hutchinson, G. E. (1957). Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 22(2), 415–427. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1101>
- Irving, R. S. (1980). The systematics of Hedeoma (Labiatae). *Contributions to Botany*, 8(3), 218–295. <http://www.jstor.org/stable/23909236>
- Jarvis, A., Williams, K., Williams, D., Guarino, L., Caballero, P. J. & Mottram, G. (2005). Use of GIS for optimizing a collecting mission for a rare wild pepper (*Capsicum flexuosum* Sendtn.) in Paraguay. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52(6), 671–682. <https://doi.org/10.1007/s10722-003-6020-x>
- Juárez, M. A., van Baren, C., Rosselot, V., Di Leo Lira, P., Martínez, A., Retta, D., Elechosa, M. A. & Bandoni, A. L. (2018). Diferencias en la composición de los aceites esenciales de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling (peperina) y *Hedeoma multiflora* Benth. (“peperina de las lomas”), en poblaciones de San Luis. *Dominguezia*, 34(Suplemento), 53.
- Kani, I. (2011). Rare and endemic species: why are they prone to extinction? *Turk. J. Bot.*, 35, 411–417. <https://doi.org/10.3906/bot-1012-90>
- Kass, J. M., Vilela, B., Aiello-Lammens, M. E., Muscarella, R., Merow, C. & Anderson, R. P. (2018). Wallace: A flexible platform for reproducible modeling of species niches and distributions built for community expansion. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(4), 1151–1156. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12945>
- Koroch, A. R., Juliani, H. R., Juliani, H. R. & Trippi, V. S. (1997). Micropropagation and acclimatization of *Hedeoma multiflorum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48(3), 213–217. <https://doi.org/10.1023/A:1005804121136>
- Lagrotteria, M. & Lozada, C. (1993). Medicinal and aromatic plants from Cordoba, Argentina; their commercial and socio cultural aspects. *Acta Horticulturae*, 101–106.
- Lenoir, J. & Svenning, J. C. (2015). Climate-related range shifts - a global multidimensional synthesis and new research directions. *Ecography*, 38(1), 15–28. <https://doi.org/10.1111/ecog.00967>
- Lobo, J. M. & Hortal, J. (2003). Modelos predictivos: Un atajo para describir la distribución de la diversidad biológica. *Ecosistemas*, 12(1). <http://www.aeet.org/ecosistemas/031/investigacion3.htm>
- Lobo, J. M., Jiménez-Valverde, A. & Real, R. (2008). AUC: a misleading measure of the performance of predictive distribution models. *Global Ecology and Biogeography*, 17(2), 145–151. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2007.00358.x>
- Luján, M. C. & Martínez, G. J. (2017). Dinámica del conocimiento etnobotánico en poblaciones urbanas y rurales de Córdoba (Argentina). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 16(3), 278–302.
- Luján, M. C. & Martínez, G. J. (2019). Etnobotánica médica urbana y periurbana de la ciudad de Córdoba (Argentina). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 18(2), 155–196.
- Martínez-Meyer, E., Peterson, A. T., Servín, J. I. & Kiff, L. F. (2006). Ecological niche modelling and prioritizing areas for species reintroductions. *Oryx*, 40(4), 411–418.

<https://doi.org/10.1017/S0030605306001360>

- Martínez, G. J. (2005). Recolección y comercialización de plantas medicinales en el Departamento Santa María, Provincia de Córdoba, Argentina. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 24(4), 575–584.
- McClatchey, W. (2005). Exorcizing Misleading Terms from Ethnobotany. *Ethnobotany Research and Applications*, 3, 001. <https://doi.org/10.17348/era.3.0.1-4>
- Menseguez, P., Galetto, L. & Anton, A. M. (2007). El uso de plantas medicinales en la población campesina de El Puesto (Córdoba, Argentina). *Kurtziana*, 33(1), 89–102. <https://www.researchgate.net/publication/262673690>
- Montes, A. L. (1964). *La producción de plantas aromáticas nativas*. INTA, Reunión de Programación sobre Plantas Aromáticas (No. 25; Reunión de Programación Sobre Plantas Aromáticas).
- Mota-vargas, C., Encarnacion-Luévano, A., Ortega-Andrade, M., Prieto-Torres, D., Peña-Peniche, A. & Rojas-Soto, O. (2019). Una breve introducción a los modelos de nicho ecológico. In U. A. del E. de Hidalgo (Ed.), *La Biodiversidad en un mundo cambiante: Fundamentos teóricos y metodológicos para su estudio*. (Vol. 1, Issue December, pp. 39–63). Moreno CE.
- Muñoz López de Bustamante, F. (1996). *Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado* (Ediciones Mundi-Prensa (Ed.)).
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Myrans, H., Diaz, M. V., Khoury, C. K., Carver, D., Henry, R. J. & Gleadow, R. (2020). Modelled distributions and conservation priorities of wild sorghums (*Sorghum Moench*). *Diversity and Distributions*, 26(12), 1727–1740. <https://doi.org/10.1111/ddi.13166>
- Nori, J., Urbina-Cardona, J. N., Loyola, R. D., Lescano, J. N. & Leynaud, G. C. (2011). Climate Change and American Bullfrog Invasion: What Could We Expect in South America? *PLoS ONE*, 6(10), e25718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025718>
- Olmos, S., Luciani, G. & Galdeano, E. (2010). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. In G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp & L. Mroginski (Eds.), *Bioteología y Mejoramiento Vegetal II* (Segunda, pp. 17–25). INTA.
- Ordóñez, A., Baldoncini, S., Berio, G., Chaves, G., Bled, L., Massuh, Y., Liébana, C., Torres, L. & Ojeda, M. (2006). Domestication of native aromatic plants. *Molecular Medicinal Chemistry*, 11(December), 58–59. <http://www.idecefyn.com.ar>
- Orlowsky, B. & Seneviratne, S. I. (2011). Investigating spatial climate relations using CARTs: An application to persistent hot days in a multimodel ensemble. *Journal of Geophysical Research Atmospheres*, 116(14), 1–13. <https://doi.org/10.1029/2010JD015188>
- Padulosi, S. & Hoeschle-Zeledon, I. (2004). ¿ A qué denominamos especies subutilizadas ? *LEISA Revista de Agroecología*, 6–8. <http://www.leisa-al.org/web/index.php/volumen-20-numero-1/2117-a-que-denominamos-especies-subutilizadas>
- Palacio García-Nieto, L. (2000). Las plantas medicinales y aromáticas Una alternativa de futuro. *Boletín Económico de ICE*, 2652, 29–40. http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=127776%5Cnhttp://www.revistasice.info/cahepdf/BICE_2652_29-39_977BC76F34053588C6F2B6AD9316C0C4.pdf
- Pascual Casamayor, D., Pérez Campos, Y. E., Morales Guerrero, I., Castellans coloma, I. &

- González Heredia, E. (2014). Historia de la medicina. *Medisan*, 18(10), 1467–1474.
- Pedranzani, H. E., Quiroga, A. M., Martínez, E. & Fernández, E. (2002). Regeneración de plantas enteras de “peperina de las lomas” (*Hedeoma multiflorum* Benth) mediante el cultivo in vitro. *Phyton*, 207–212.
- Peralta, P. A., Sosa, A. V., Mazzi, M. J., Vazquez, S. & Bach, H. G. (2019). Efectos de la colchicina en semillas de “Peperina de las Lomas” (*Hedeoma multiflora* Benth.). *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 54(Supl.), 126.
- Peralta, P. A., Guariniello, J., Aguirre, G., Iannicelli, J. & Escandón, A. S. (2017). *Propagación in vitro de peperina de las lomas (Hedeoma multiflorum Benth). Una nativa en riesgo de extinción*. www.redbioargentina.org.ar%2Fsimposio-2017-bahia-blanca%2Ffiles%2Fposters%2FBV27-peralta-et-al.docx&usg=AOvVaw0WKDdo9y31Jgph
- Peralta, P. A., Guariniello, J., Leal, M. & Escandón, A. S. (2016). Establecimiento del cultivo in vitro de peperina de las lomas (*hedeoma multiflorum* Benth). *Dominguezia*, 32(2), 69.
- Peterson, A. T. (2001). Predicting Species' Geographic Distributions Based on Ecological Niche Modeling. *The Condor*, 103(3), 599–605. [https://doi.org/10.1650/0010-5422\(2001\)103\[0599:psgdbo\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1650/0010-5422(2001)103[0599:psgdbo]2.0.co;2)
- Peterson, A. T., Papeş, M. & Soberón, J. (2008). Rethinking receiver operating characteristic analysis applications in ecological niche modeling. *Ecological Modelling*, 213(1), 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2007.11.008>
- Phillips, S. J., Anderson, R. P. & Schapire, R. E. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 190(3–4), 231–259. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2005.03.026>
- Phillips, S. J. & Dudík, M. (2008). Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography*, 31, 161–175. <https://doi.org/10.1111/j.2007.0906-7590.05203.x>
- Pires, A., Fernandez, F. A. & Barros, C. S. (2006). Vivendo em um mundo em pedaços: efeitos da fragmentação florestal sobre comunidades e populações animais. In M. V. S. & M. V. A. C. F. D. Rocha, H. G. Bergallo (Ed.), *Biologia da Conservação: Essências* (pp. 231–260).
- Pochettino, M. L., Arenas, P., Sánchez, D. & Correa, R. (2008). Conocimiento botánico tradicional, circulación comercial y consumo de plantas medicinales en un área urbana de Argentina. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 7(3), 141–148.
- Porfirio, L. L., Harris, R. M. B., Lefroy, E. C., Hugh, S., Gould, S. F., Lee, G., Bindoff, N. L. & Mackey, B. (2014). Improving the Use of Species Distribution Models in Conservation Planning and Management under Climate Change. *PLoS ONE*, 9(11), e113749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113749>
- Reddy, A. R., Rasineni, G. K. & Raghavendra, A. S. (2010). The impact of global elevated CO2 concentration on photosynthesis and plant productivity. *Current Science*, 99(1), 46–57.
- Renison, D., Hensen, I., Suarez, R., Cingolani, A. M., Marcora, P. & Giorgis, M. A. (2010). Soil conservation in Polylepis mountain forests of Central Argentina: Is livestock reducing our natural capital? *Austral Ecology*, 35(4), 435–443. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2009.02055.x>
- Reyer, C. P. O., Adams, S., Albrecht, T., Baarsch, F., Boit, A., Canales Trujillo, N., Carlsburg, M., Coumou, D., Eden, A., Fernandes, E., Langerwisch, F., Marcus, R., Mengel, M., Mira-Salama, D., Perette, M., Pereznieta, P., Rammig, A., Reinhardt, J., Robinson, A., ... Thonicke, K. (2017). Climate change impacts in Latin America and the Caribbean and their

- implications for development. *Regional Environmental Change*, 17(6), 1601–1621. <https://doi.org/10.1007/s10113-015-0854-6>
- Rocha, P. J. (2004). Conceptos básicos en biotecnología de la palma de aceite Useful Basic Concepts in Oil Palm Biotechnology. *Palmas*, 25, 11–17.
- Rodríguez Beraud, M., Carrillo López, R., Chacón Fuentes, M., Hormazábal Vásquez, N., Tampe Pérez, J. & Tighe Neira, R. (2015). Enraizamiento in vitro y ex vitro de microtallos de *Ugni molinae* Turcz., una especie nativa de Chile. *Gayana. Botánica*, 72(1), 14–20. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432015000100002>
- Rutherford, M. C., Powrie, L. W. & Schulze, R. E. (1999). Climate change in conservation areas of South Africa and its potential impact on floristic composition: A first assessment. *Diversity and Distributions*, 5(6), 253–262. <https://doi.org/10.1046/j.1472-4642.1999.00061.x>
- Sinclair, S. J., White, M. D. & Newell, G. R. (2010). How useful are species distribution models for managing biodiversity under future climates? *Ecology and Society*, 15(1). <https://doi.org/10.5751/ES-03089-150108>
- Soberon, J. & Peterson, A. T. (2005). Interpretation of Models of Fundamental Ecological Niches and Species' Distributional Areas. *Biodiversity Informatics*, 2(0), 1–10. <https://doi.org/10.17161/bi.v2i0.4>
- Sosa, A. V., Vázquez, S., Bach, H. G. & Peralta, P. A. (2019). Exomorfoloía de semillas de “Peperina de las Lomas” (*Hedeoma multiflora* Benth.) de una población silvestre y su descendencia ex vitro. *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 54(Supl.), 108.
- Suárez, D., Serdiuk, I. & Rolando, R. (2000). Estudios preliminares de multiplicación por semillas y obtención de plantines de *Hedeoma multiflora* Benth. *Anales de SAIPA*, 16, 85–90.
- Tarbuck, E. J. & Lutgens, F. K. (2013). *Ciencias de la tierra: una introducción a la geología física* (R. Miguel (Ed.); Décima). Pearson Educación S.A.
- Thomas, C. D., Cameron, A., Green, R. E., Bakkenes, M., Beaumont, L. J., Collingham, Y. C., Erasmus, B. F. N., de Siqueira, M. F., Grainger, A., Hannah, L., Hughes, L., Huntley, B., van Jaarsveld, A. S., Midgley, G. F., Miles, L., Ortega-Huerta, M. A., Townsend Peterson, A., Phillips, O. L. & Williams, S. E. (2004). Extinction risk from climate change. *Nature*, 427(6970), 145–148. <https://doi.org/10.1038/nature02121>
- Toledo, V. M. (2005). La memoria tradicional: la importancia agroecológica de los saberes locales. *Revista de Agroecología*, 16–19. <http://www.leisa-al.org/web/index.php/volumen-20-numero-4/2073-la-memoria-tradicional-la-importancia-agroecologica-de-los-saberes-locales>
- Townsend Peterson, A. (2007). Why not WhyWhere: The need for more complex models of simpler environmental spaces. *Ecological Modelling*, 203(3–4), 527–530. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2006.12.023>
- Uribe, M. E., Ulloa, J., Delaveau, C., Sáez, K., Muñoz, F. & Cartes, P. (2012). Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento in vitro de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Gayana. Botánica*, 69(1), 105–112. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432012000100010>
- van Baren, C. M., Sanguinetti, S., Di Leo Lira, P., Bandoni, A. L., Juárez, M. A., Elechosa, M. A., Molina, A. M., Fernández, E. A. & Martínez, E. (2010). El aceite esencial de *Hedeoma multiflora* Benth. (Lamiaceae) de poblaciones naturales en la provincia de San Luis, Argentina. Estudio comparativo. *Dominguezia*, 26(1).

- Van Der Putten, W. H., Macel, M. & Visser, M. E. (2010). Predicting species distribution and abundance responses to climate change: Why it is essential to include biotic interactions across trophic levels. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1549), 2025–2034. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0037>
- Vazquez, A. M., Goleniowski, M. E., Brunetti, P. C., Cantero, J. J., Demmel, M. G., Criado, S., Ferrari, M. C. & Aimar, M. L. (2007). Estudio comparativo de la composición química (Compuestos orgánicos volátiles) por HS-SPME / GC-MS de *Hedeoma multiflora* Benth. (Lamiaceae), micropropagadas y de poblaciones silvestres. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(5), 284–285. www.redalyc.org/articulo.oa?id=85617508076
- Wiens, J. A., Stralberg, D., Jongsomjit, D., Howell, C. A. & Snyder, M. A. (2009). Niches, models, and climate change: Assessing the assumptions and uncertainties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(Supplement_2), 19729–19736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901639106>
- Zak, M. R., Cabido, M. & Hodgson, J. G. (2004). Do subtropical seasonal forests in the Gran Chaco, Argentina, have a future? *Biological Conservation*, 120(4), 589–598. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2004.03.034>