

## Obtención de un nuevo genotipo de *Achylocrine satureioides* Lam (Asteraceae) por poliploidización *in vivo*

### Obtaining a new genotype tetraploid of *Achylocrine satureioides* Lam (Asteraceae) by *in vivo* poliploidization

#### Jesica Iannicelli

Instituto de Genética Ewald A Favret (CNIA-CICVyA-INTA), Argentina

#### Verónica Bugallo

Instituto de Floricultura (CNIA-CIRN-INTA), Argentina

#### Andrea Coviella

Instituto de Floricultura (CNIA-CIRN-INTA), Argentina

#### María Carolina Galli

AER INTA-Concarán (Regional Center La Pampa-San Luís, INTA), Argentina

#### Oscar A. Risso

AER INTA-Concarán (Regional Center La Pampa-San Luís, INTA), Argentina

#### Susana Costoya

Instituto de Genética Ewald A Favret (CNIA-CICVyA-INTA), Argentina

#### Alejandro S. Escandón\*

Instituto de Genética Ewald A Favret (CNIA-CICVyA-INTA), Argentina

#### Revista de la Facultad de Agronomía

Universidad Nacional de La Plata, Argentina

ISSN: 1669-9513

Periodicidad: Semestral

Vol. 121 (Num. Esp. 2), 2022

redaccion.revista@agro.unlp.edu.ar

Recepción: 01/09/ 2022

Aprobación: 23/09/ 2022

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/23/233546011/>

DOI: <https://doi.org/10.24215/16699513e095>

\*Autor de correspondencia: [Escandon.alejandro@inta.gob.ar](mailto:Escandon.alejandro@inta.gob.ar)

## Resumen

*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. es un arbusto originario de América del Sur. Es muy utilizada en la medicina popular, además, por su color y arquitectura, tiene potencial ornamental como planta para decorar parques o jardines. Como la mayoría de las plantas nativas aromáticas-medicinales, sus poblaciones sufren una fuerte erosión genética debido a acciones antrópicas, como la sobreexplotación y el avance de la frontera agrícola o la urbana. Una forma de ayudar a evitar la extinción de poblaciones es comenzar con el proceso de domesticación y mejora de estas especies, para cambiar el paradigma extractivista por el productivo. La obtención de nuevas variedades poliploides es una forma rápida de generar individuos con órganos más grandes y mayor resistencia al estrés, entre otras propiedades que caracterizan a la poliploidía, para utilizarlos directamente o como insumo para un programa de mejoramiento. El objetivo del presente trabajo es obtener y caracterizar individuos poliploides de *A. satureioides* aplicando colchicina, *in vivo*, sobre sus yemas laterales.

**Palabras clave:** marcela, plantas aromático-medicinales, especies nativas, colchicina, aprovechamiento sostenible

## Abstract

*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. is a shrub native to South America It is a plant widely used in popular medicine. In addition, due to its colour and architecture, *A. satureioides* has ornamental potential as a plant to decorate parks or gardens. Like most medicinal aromatic natives, their populations suffer a strong genetic erosion due to anthropogenic actions such as over-exploitation, and the advance of the agricultural frontier. One way to help prevent the extinction of populations is to start with the process of domestication and improvement of these species, to change the extractivist paradigm for the productive one. Obtaining new polyploid varieties, with the advantages they offer, is a quick way to generate individuals with larger organs and greater resistance to stress, among other properties, as input for a breeding program. The goal of the present work is to obtain and characterize polyploid individuals of *A. satureioides* by applying colchicine, *in vivo*, onto their lateral buds.

**Keywords:** marcela, aromatic and medicinal plants, land races, colchicine, sustainable use

## INTRODUCCIÓN

*Achyrocline satuireioides* (Lam.) DC. (Asteraceae), (marcela, macela, marcela hembra, jate'i ka'a, vira-vira), es una planta arbustiva que puede alcanzar hasta 1.00 metro de altura, es nativa de América del Sur y se la encuentra desde Venezuela hasta el centro-sur de Argentina (Alonso y Desmarchelier, 2015). Sus hábitats van desde humedales hasta terrenos arenosos (Crisci et al., 2001). Sus flores y hojas tienen un intenso aroma anisado; la parte aérea es ampliamente utilizada como fitoterapia por sus propiedades antiespasmódicas, hepatoprotectoras, colagogas, coleréticas, relajantes del músculo liso y antitusivas, entre otras (Retta, 2014; Barboza et al. 2009; Kadarian, 2002). Asimismo, por el color verde grisáceo que caracteriza a su follaje, las muy abundantes inflorescencias de color amarillo pálido que crecen en pequeños racimos y por su arquitectura formando un arbusto bien definido y redondeado, *A. satuireioides* también tiene un interesante potencial ornamental como planta de jardín.

Es un hecho conocido que, de las 400.000 especies vegetales descritas, alrededor del 10% se utilizan, por sus propiedades aromáticas-medicinales-condimentarias, en la industria farmacéutica, alimentaria, licorera y herbolaria. Pero sólo se cultivan unos pocos cientos, siendo el modelo extractivista el sistema imperante para la obtención de esta materia prima. Al igual que la mayoría de las especies de plantas aromáticas y medicinales, la marcela sufre una sobreexplotación en sus propios hábitats. Varias de sus poblaciones se encuentran en serio riesgo de extinción y, dado que la parte de interés de la planta es la inflorescencia antes de la formación de la semilla, las buenas prácticas de recolección deben ser aplicadas en forma estricta para evitar comprometer la dispersión de la descendencia (Elechosa et al., 2009; Galli et al., 2019).

Una estrategia para evitar la erosión genética es, como se mencionó anteriormente, estimular las buenas prácticas de recolección, es decir, no arrancar las plantas, esparcir las semillas, si las hubiere, respetar sus tiempos biológicos y en el caso particular de marcela dejar algunas flores por planta para permitirles semillar (Elechosa et al., 2009; Galli et al. al., 2019). Otra alternativa, no excluyente, es ofrecer a los productores genotipos mejorados con mayor productividad de metabolitos secundarios. Debido a sus características, la obtención de individuos poliploides es una alternativa interesante como base para un programa de mejoramiento genético de estas especies (Iannicelli et al., 2016a; 2016b; 2018 y 2020;) para promover el cultivo y, de esta forma, profesionalizar y dar formalidad a la cadena productiva (Escandón 2017; 2022).

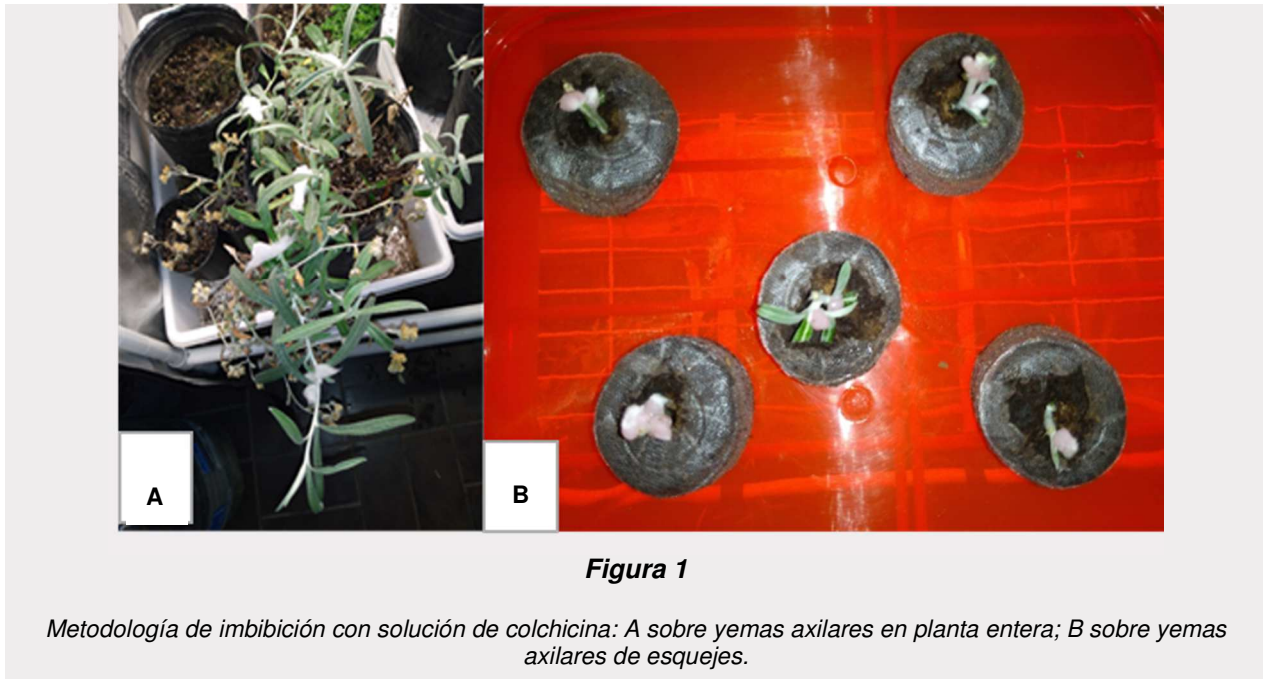
El objetivo de este trabajo fue obtener plantas tetraploides que sirvieran como base para un programa de mejoramiento para obtener una nueva variedad con características mejoradas, tales como mayor productividad de metabolitos secundarios, resistencia al estrés, mayor biomasa, hojas y racimos florales más grandes y de color más intenso, como es esperable de las variedades vegetales poliploides (Salma et al., 2017; Iannicelli et al., 2020).

## METODOLOGÍA

El material vegetal fue colectado en la localidad de Dique Cruz de Piedra, Provincia de San Luis (66°12'45.8" S, 33°15'59"W, 910 msnm). La colecta autorizada por resolución No.: 142-PRN-2022 del Gobierno de la Provincia de San Luis, Argentina.

Un clon de esta entrada se multiplicó mediante esquejes en condiciones estándar de invernadero. Para el tratamiento con colchicina se tomó como referencia el protocolo propuesto por Ackerman y Dermen (1972), con la siguiente modificación: se colocaron pedazos de algodón embebidos en solución de colchicina al 0.1% (P/V) sobre los meristemas axilares de ramas con la yema apical escindida (Figura 1A). Como control se usó algodón empapado en agua (n=20). La renovación de la solución de colchicina se realizó cada 3 días (5 veces) y luego se dejaron crecer, libremente, los brotes laterales.

Una vez que los brotes axilares desarrollados alcanzaron 2-3 entrenudos, se escindieron y trasladaron como esquejes a un sustrato estéril después de impregnar la base con IBA 3000 ppm en talco (Figura 2A) y se colocaron en cámara húmeda hasta su enraizamiento y aclimatación. Posteriormente, las plántulas enraizadas se transfirieron a macetas de 12 cm de diámetro y se cultivaron en una cámara de crecimiento con 24 ±2 °C, la irradiación fue de 103,74 µmol/m<sup>2</sup>·seg. Finalmente, las plantas aclimatadas se transfirieron bajo condiciones estándar de invernadero. Se hicieron dos repeticiones de este ensayo.



Como método alternativo se ensayó el mismo sistema de algodón humedecido en solución de colchicina al 0,1%, pero sobre yemas axilares de esquejes mantenidos en cámara húmeda. Una o dos piezas de algodón por esqueje hasta completar n=50 (Figura 1B).

### **CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA**

Para establecer las diferencias fenotípicas entre los individuos diploide y el tetraploide, se midieron el tamaño de las hojas, las inflorescencias y el extremo apical florecido. Las hojas e inflorescencias se midieron con un calibre marca Mitutoyo. Se determinaron el ancho y largo de 10 hojas enteras y totalmente expandidas. Se estableció como medida la media de 10 determinaciones. El mismo criterio de precisión se utilizó para determinar el diámetro de las inflorescencias, el extremo apical florecido y la longitud del capítulo floral. El análisis estadístico se realizó con el software InfoStats.

Para determinar las cantidades de ADN de las muestras se utilizó un citómetro de flujo (CyFlow Ploidy Analyser, Partec) y, posteriormente, los niveles de ploidía se confirmaron mediante recuento de cromosomas. Para las mediciones de citometría de flujo, y de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se sumergieron aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> de tejido foliar tomado de todas las ramas de la planta en tampón de extracción (tampón Otto I) compuesto por ácido cítrico 0,1 M y Tween 20 al 0,5 % (Otto, 1990) y dividido con una navaja afilada. Después de filtrar con un filtro de 50 µm de paso de poro, la suspensión de núcleos se tiñó con una solución de diclorhidrato de 4,6-diamidino 2-fenil-indol (4 µg/ml) (DAPI) (Sigma D9542) en una solución tampón (tampón Otto II) compuesto por Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,4 M (Otto, 1990). Los diferentes parámetros del citómetro de flujo se ajustaron con material no tratado para obtener lecturas bien definidas y reproducibles. Para el material diploide, el citómetro de flujo se ajustó a una Ganancia de 50. Para obtener los gráficos correspondientes, los datos obtenidos por un Partec CyFlow Ploidy Analyzer se corrieron en el programa Flowing software 2.5 1.

Para el recuento de cromosomas se colectaron raíces de plantas en macetas y se pre trataron con solución de 8-hidroxiquinolina al 0.002% con 3.125 ppm de cicloheximida (Cuco et al., 2003) por 4 horas a 5°C. Luego se fijó en una solución de etanol:ácido acético 3:1 durante 72 horas. Las raíces se hidrolizaron

con HCl 1N durante 10 minutos en estufa a 60°C, se tiñeron con Feulgen durante 90 minutos y se trataron con una solución enzimática de 2% de celulasas y 20% de pectinasas. Finalmente, las puntas de las raíces se montaron con carmín acético al 2%. Las preparaciones se observaron en un microscopio óptico Olympus BX 50 y se fotografiaron con una cámara digital Olympus DP72 utilizando el software CellSens Standard.

## RESULTADOS

Existen diferentes técnicas para la obtención de autoploides sintéticos, las aplicadas en este trabajo, la germinación de semillas en contacto con el mutágeno (Blasco et al., 2015), o los métodos *in vitro* (para revisión ver Salma et al., 2017 y Iannicelli et al., 2018). Ambas técnicas utilizadas en este estudio, basadas en el protocolo propuesto por Ackerman y Dermen (1972), con modificaciones (Ikuo Miyajima, com. pers.), mostraron ser muy sencillas y económicas de aplicar, lo que las hace aptas para laboratorios de baja complejidad o pocos recursos.

En el ensayo sobre planta entera se desarrollaron (en diversos grados) un total de 30 brotes laterales en las plantas tratadas con colchicina, de los cuales fue posible recuperar un brote poliploide, del cual se obtuvieron esquejes y plantas viables. La Figura 2 se muestra el ensayo completo, desde el corte de la rama lateral en la etapa de enraizamiento y aclimatación (Figura 2A), pasaje a maceta (Figura 2B) y, finalmente, su traslado al invernáculo (Figura 2C). Es posible apreciar la diferente arquitectura entre plantas tetraploides y diploides que, si bien muestra un menor desarrollo en cuanto a número de entrenudos, las plantas se observan más erguidas.

En la repetición del ensayo sobre planta completa, aunque se desarrollaron brotes laterales, ninguno de los esquejes superó el estado de enraizamiento y no fue posible la detección de poliploidía. Dado lo simple y económico de la técnica propuesta, el incremento del “n” del tratamiento no sería un inconveniente para incrementar su reproducibilidad y el número de eventos de poliploidía.

Por otro lado, la prueba realizada con esquejes en cámara húmeda no arrojó ningún resultado positivo, no se logró el enraizamiento de ninguno de los esquejes, que finalmente murieron en su totalidad. Aunque no se ahondaron las razones por las que esta alternativa no funcionó, se podría inferir que se expuso los esquejes a una situación de estrés muy exigente de enraizamiento y de supervivencia a la toxicidad del alcaloide. Esta estrategia fue abandonada.

La Tabla 1 resume las diferencias entre plantas diploides y tetraploides. Como se puede observar en la Figura 2C, el tamaño de las plantas tetraploides es mayor que el de las diploides, y aunque no se observaron diferencias significativas en el diámetro del tallo, las plantas tetraploides son más erguidas y tienen mayor volumen de planta. Esta última característica puede deberse a la mayor área foliar.

La Figura 3 muestra las diferencias fenotípicas entre hojas y flores de las plantas diploide y tetraploide. Si bien existe variabilidad en el tamaño de las hojas en ambos genotipos, siempre es mayor en el tetraploide. Este detalle no sólo podría estar aportando a incrementar la productividad de los principios activos de la marcela, como se observó en otras especies (Iannicelli et al., 2016), sino también contribuye al valor ornamental del nuevo genotipo (Figura 1C).

Se midió el contenido de ADN de las plantas control y tetraploide, y se realizó el conteo de cromosomas, como verificación final y concluyente del nivel de ploidía. La Figura 4 muestra la combinación de los perfiles obtenidos, por citometría de flujo, de un individuo control (2n) y el tetraploide. Ambos picos muestran buena definición, lo que indica claramente que son individuos sólidos en cuanto a su nivel de ploidía. En este sentido, el recuento de cromosomas (Figura 5) confirma el nivel de ploidía indicado por el análisis del citómetro de flujo.

**Figura 2**

Resultado de las respuestas a los tratamientos con colchicina: A: esquejes de brotes tratados en etapa de enraizamiento y aclimatación; B: plantas aclimatadas transferidas a macetas; C: plantas adultas bajo condiciones de invernáculo estándar. La flecha indica la fila de clones poliploides.

**Tabla 1**

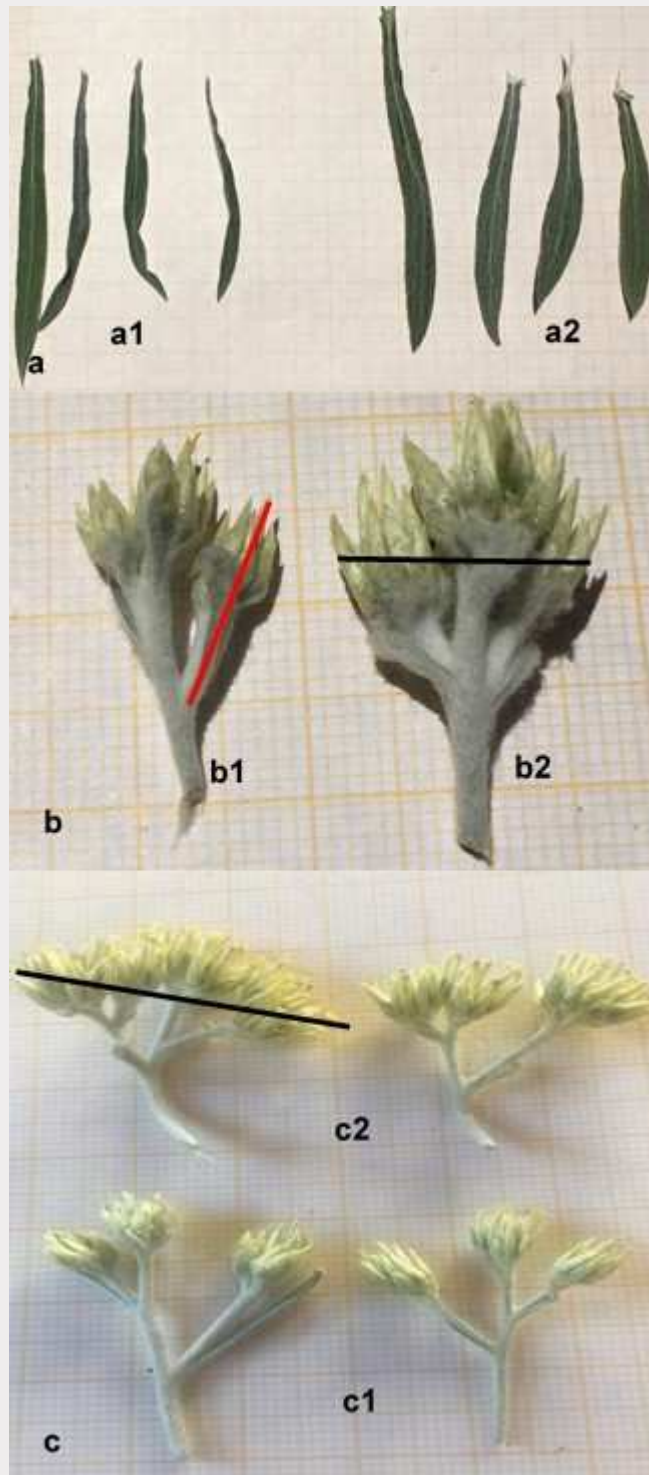
Diferencias en el tamaño de hojas e inflorescencias, contenido de ADN y número de cromosomas entre la nueva variedad tetraploide y el individuo original. Diferente indica diferencias significativas (a;b) Prueba de Tukey ( $p>0.05$ ).

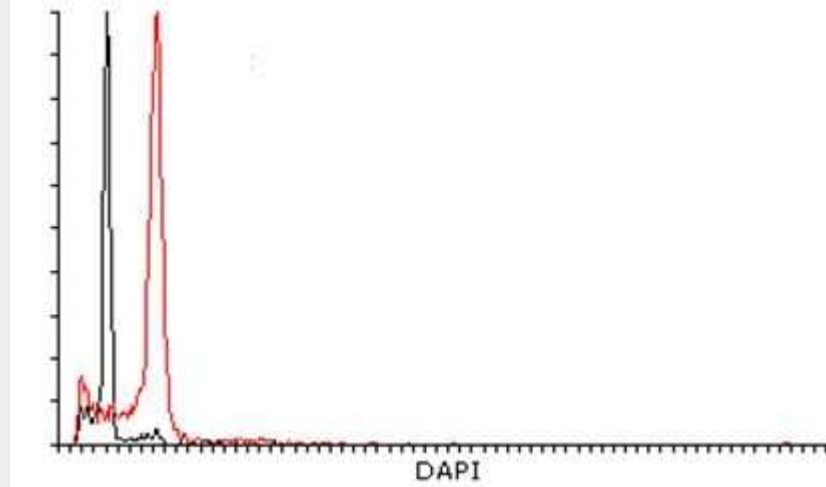
Rasgo	Nivel de ploidía	
	diploide	tetraploide
Hojas		
Largo (mm)	63,42 ± 8,25 <sup>a</sup>	78,56 ± 6,94 <sup>b</sup>
Ancho (mm)	4,94 ± 1,75 <sup>a</sup>	10,5 ± 1,7 <sup>b</sup>
Inflorescencias		
Diámetro (mm) <sup>1</sup>	4,25 ± 0,11 <sup>a</sup>	7,04 ± 0,19 <sup>b</sup>
Longitud de la flor marginal (mm) <sup>2</sup>	3,22 ± 0,05 <sup>a</sup>	6,007 ± 0,03 <sup>b</sup>
Tamaño del ápice floral (mm) <sup>3</sup>	22,38 ± 0,65 <sup>a</sup>	31,07 ± 0,65 <sup>b</sup>
Contenido de ADN (unidades arbitrarias)	4	8
Número de cromosomas	30	60



**Figura 3**

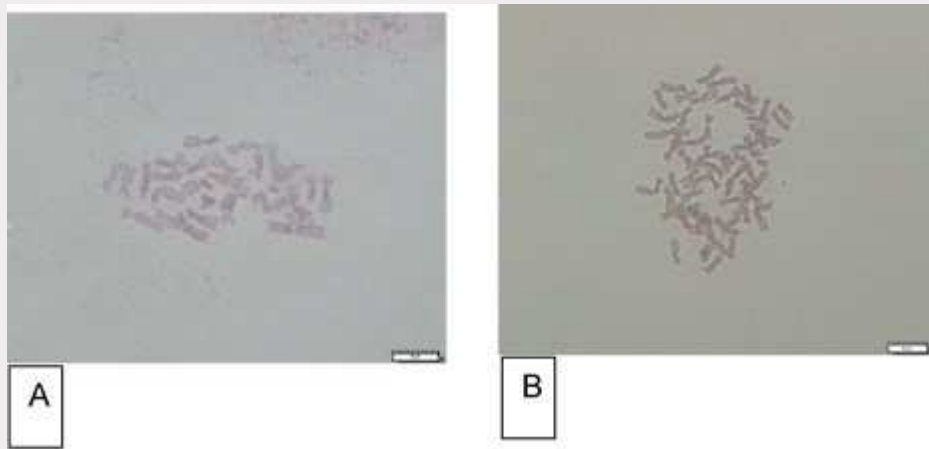
a. Grupo de hojas pertenecientes a una planta diploide (a1) y tetraploide (a2). b. inflorescencia diploide (b1), la línea roja indica la longitud de la flor marginal. Inflorescencia tetraploide (b2), la línea negra indica el diámetro de la inflorescencia. c. apariencia de los extremos florales, c1) Diploide, c2) Tetraploide, la línea negra indica el diámetro del ápice floral.





**Figura 4**

Perfiles obtenidos por citometría de flujo combinando células diploides del individuo original (negro) con tetraploides de la nueva variedad (rojo).



**Figura 5**

A) Cromosomas de *A. satureioides*,  $2n=30$ . B) Cromosomas of *A. satureioides* var. *Lamarce-INTA*,  $4n=60$ . Barr =  $5\ \mu$ .

## DISCUSIÓN

La poliploidía, definida como la coexistencia de tres o más juegos completos de cromosomas en las células de un organismo, es una fuerza importante en la historia evolutiva de las plantas vasculares y juega un papel clave en el mejoramiento de plantas (Sattler et al., 2016). En las últimas décadas, se han desarrollado artificialmente cultivares mejorados de especies económicamente importantes mediante la inducción de autoploidía con agentes químicos (Cubero, 2003).



Si bien no existe un protocolo estándar para la obtención de autopoloides sintéticos y, aunque el éxito no está garantizado, es importante considerar las siguientes premisas: i) utilizar una especie diploide con bajo número de cromosomas; ii) la especie sea alógama; iii) fácil propagación vegetativa (Cubero, 2003). Asimismo, y dado que el fenómeno de poliploidización no sólo no es un proceso lineal, sino que es fuente de variabilidad, es conveniente obtener el mayor número de eventos de poliploidización posible, de manera de poder seleccionar al más promisorio. En este caso se logró el objetivo buscado, la obtención de poliploidía en *A. satureioides*, pero sólo fue posible recuperar un individuo viable. Sería necesario ajustar la forma de aplicación del alcaloide, de una manera más controlada que permita su accesibilidad a todos los meristemas en forma homogénea y de esta manera lograr un mayor número de brotes afectados por la colchicina. Para ello se debe tener control de variantes como, por ejemplo, la evaporación de la solución de colchicina por corrientes de aire y cambios de temperatura, frecuentes en un invernáculo, que alteran el gradiente del alcaloide desde la fuente al blanco y esto puede afectar la reproducibilidad de la respuesta (Iannicelli et al. al., 2016a).

Las plantas aromáticas medicinales sufren una intensa presión sobre sus poblaciones más que nada por acciones de origen antrópico, ya sea por la sobreexplotación, el avance de la frontera agrícola o la ocupación urbana de sus hábitats; muchas de estas poblaciones se encuentran en grave riesgo de extinción (Escandón, 2017). En el caso de *A. satureioides* se observa un importante efecto del avance de la zona urbana en las regiones serranas donde habita, produciendo una alteración de su nicho y afectando sus poblaciones posiblemente en mayor medida que la actividad de colecta realizada en forma sustentable (Galli et al., 2019).

La obtención de autopoloides sintéticos, ya sea de manera *in vivo* o *in vitro*, ofrece una alternativa para la creación de nuevos genotipos en tiempos relativamente cortos, que pueden ser utilizados ya sea, directamente, como materiales mejorados o, como insumos para un programa de mejoramiento, para ofrecer a los productores nuevas variedades mejoradas y promover, de esta manera, un cambio en el paradigma de aprovechamiento de estas especies de un sistema colector a uno productivo.

El uso sostenible de estos recursos genéticos permitirá, no sólo minimizar la erosión genética a la que actualmente están expuestos, sino también profesionalizar la cadena productiva, haciéndola más eficiente mediante el uso de insumos de calidad mejorada y homogénea. Así como inducir el desarrollo de economías regionales a partir del uso racional de los recursos locales (Philip, 2005; Galli et al., 2019). Además, el manejo de la especie en cultivo permite condiciones de seguridad en el trabajo y tiempos de cosecha reducidos y menor esfuerzo físico en comparación con las que se realizan en estado silvestre, que generalmente se dan en laderas rocosas o en condiciones adicionales de riesgo (Galli et al. 2019).

En el presente trabajo se obtuvo por primera vez un individuo tetraploide de *A. satureioides*. El nuevo genotipo muestra interesantes modificaciones, como el tamaño de hojas e inflorescencias, que aumentan, potencialmente, su valor aromático y ornamental, y podría servir como insumo en un programa de mejoramiento genético de esta especie ya que, además, es relativamente fácil de multiplicar agámicamente.

## Agradecimientos

El presente trabajo se realizó con el apoyo financiero del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), en el marco de los PEi 140 y PEi 115.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ackerman, W.L. y H. Dermen** (1972). A fertile colchipsoid from a sterile interspecific camellia hybrid. *The Journal of Heredity* 63 (2): 55–59.
- Alonso, J. y C. Demarchelier** (2015). *Plantas Medicinales Autóctonas de Argentina*, Edit. Corpus. 3ª. Ed. Sociedad Latinoamericana de Fitomedicina. Buenos Aires, Argentina.
- Barboza, G.; Cantero, J.; Nuñez, C.O.; Pacciaroni, A. y L. Espinar** (2009). Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana* 34: 7-365.
- Blasco, M., Badenes, M.L. y M.d.M. Naval** (2015) Colchicine-induced polyploidy in loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120: 453–461.
- Crisci, J., Freire, S., Sancho, G. y L. Katinas.** (2001). Historical biogeography of the Asteraceae from Tandilia and Ventania mountain ranges (Buenos Aires, Argentina). *Caldasia* 23 (1): 21-41.

- Cubero, J.I.** (2003) Los poliploides en la mejora vegetal. Capítulo 15. En: Introducción a la mejora genética. 2da. Edición. Ed. Mundi-Prensa. Madrid-Barcelona-Mexico. 325-351 pp.
- Cuco, S.M.; Mondin, M; Vieira, MLC y M.L.R. Aguiar-Perecin.** (2003). Técnicas para a obtencao de preparacoes citológicas com alta frecuencia de metafases mitóticas em plantas: Passiflora (Passifloraceae) e Crotalaria (Leguminosae). Acta Botánica Brasilica 17(3): 363-370.
- Elechosa, M.** (Coord.). Manual de recolección sustentable de plantas aromáticas nativas de la región central y noroeste de la Argentina. Buenos Aires: Ediciones INTA, 2009. 64p.
- Escandón, A.** (2017) An opinion about the situation of native species plants. ISSN: 1414-039X - Revista Brasileira De Horticultura Ornamental 23:1.
- Escandón, A.** (2022) A point of view on genetic resources and plant breeding Revista Brasileira De Horticultura Ornamental 28 (1): 6-7.
- Galli, M.C.; Walter S.; Suárez D.A.; Suárez S.A. y O.A. Risso.** (2019). *Achyrocline satureioides* "marcela". Capítulo 2. En: Manual de buenas prácticas para recolección, cultivo y manufactura de marcela: *Achyrocline satureioides*. Eds.: Suárez S.A. y A.M. Vianco. - 1a ed. - Río Cuarto: UniRío Editora, 2019. Libro digital, PDF. Archivo Digital: descarga y online. ISBN 978-987-688-373-3. Pps.: 16-22.
- Iannicelli, J.; Elechosa, M.A.; Juárez, M.A.; Martínez, A.; Bugallo, V.; Bandoni, A.L.; Escandón, A.S. y C.M. van Baren.** (2016a) Effect of polyploidization in the production of essential oils in *Lippia integrifolia*. Industrial Crops and Products: 81: 20–29.
- Iannicelli, J.; Gauriniello, J., Pitta-Álvarez, S. y A.S. Escandón.** (2018) Traditional uses, conservation status and biotechnological advances for a group of aromatic/medicinal native plants from America. BLACPM 17 (5): 453-491.
- Iannicelli, J.; Guariniello, J.; Tossi, V.E.; Regalado J.J.; van Baren, C.M.; Pitta Álvarez, S.I. y A.S. Escandón.** (2020). The "polyploid effect" in the breeding of aromatic and medicinal species. Scientia Horticulturae 260: 1-10.
- Iannicelli, J.; Pérez de la Torre, M.; Coviella, A.; Del Valle Aguirre, E.; Elechosa, M.A.; van Baren, C.M.; Pacheco, M.G. y A.S. Escandón.** (2016b). In vitro propagation of *Lippia integrifolia* (Griseb.) Hier. and detection of genetic instability through ISSR markers of in vitro-cultured plants. Revista de Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP) 115 (1): 67-76.
- Kadarian, C.** (2002). Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (Lam) D. C. Pharmacological Research 45 (1): 57–61.
- Otto, F.** (1990). DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. Methods in Cell Biology. Crissman HA and Darzynkiewicz Z. Eds. New York: Academic Press 33: 105-110.
- Philip, D** (2005) Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas. Ed. INIA, serie FPTA-INIA 11. Capítulo 6: 35-118 pp.
- Retta, D.S.** (2014). Determinación de calidad de "marcela" *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae). Parámetros fitoquímicos. Compendio de tesis. Dominguezia 30(2): 5-17.
- Salma, U.; Kundua, S. y N. Mandal.** (2017). Artificial Polyploidy in Medicinal Plants: Advancement in the Last Two Decades and Impending Prospects. Journal of Crop Science and Biotechnology 20 (1): 9-19.
- Sattler, M.C., Carvalho, C.R. y W.R. Clarindo.** (2016) The polyploidy and its key role in plant breeding. Planta 243: 281–296.