

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA,
CITOGÉNÉTICA Y MOLECULAR DE
POBLACIONES NATURALES DE *CHRYSOLAENA
FLEXUOSA* (SIMS) H. ROB. EN EL SUDESTE
BONAERENSE**

María Lis Echeverría

Trabajo de tesis para ser presentado como requisito parcial
para optar al Título de
DOCTOR en CIENCIAS AGRARIAS

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
AGRARIAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA**

Balcarce, Argentina

27 de marzo del 2018

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA,
CITOGÉNÉTICA Y MOLECULAR DE
POBLACIONES NATURALES DE *CHRYSOLAENA
FLEXUOSA* (SIMS) H. ROB. EN EL SUDESTE
BONAERENSE**

María Lis Echeverría

.....
Directora de Tesis:

Ing. Agr. (*Ph. D.*) Elsa Lucila Camadro

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA,
CITOGÉNÉTICA Y MOLECULAR DE
POBLACIONES NATURALES DE *CHRYSOLAENA
FLEXUOSA* (SIMS) H. ROB. EN EL SUDESTE
BONAERENSE**

María Lis Echeverría

.....
Lic. (Dra.) Lidia Poggio

.....
Ing. Agr. (Dr.) Pablo Speranza

.....
Ing. Ag. (Dr.) Eric Javier Martínez

“Et per tal variar natura è bella”

Seferino Aquilano

DEDICATORIA

A Joaquín y a nuestro bebé

AGRADECIMIENTOS

A las personas que me introdujeron en la carrera doctoral, Dra. María de las Mercedes Echeverría e Ing. Agr. (M.Sc.) Sara Isabel Alonso.

A mi Directora, la Dra. Elsa Camadro, que me recibió en su grupo y me guió a lo largo de mi formación doctoral, brindándome siempre su ayuda y su cariño.

A los proyectos de la FCA-UNMdP por el financiamiento de parte de la investigación.

A los Dres. Gisela Via do Pico y Massimiliano Dematteis (Instituto de Botánica del Nordeste; Corrientes, Argentina), por proveernos de las semillas de *Chrysolea flexuosa* del noreste de la Argentina.

Al Dr. Jaroslav Doležl (Instituto de Botánica Experimental; Sokolovská, República Checa), por enviarnos desde tan lejos las semillas para obtener los estándares que nos permitieron estimar contenido de ADN.

A la Dra. Ana Clara Pontarolli (INTA Balcarce, Argentina), a la Ing. Agr. (M.Sc.) María Virginia Inza (INTA Castelar, Argentina), al Lic. (M.Sc.) Marcelo Atencio (INTA Balcarce, Argentina), y a los Dres. Ricardo Masuelli y Carlos Marfil (Fac. de Cs. Agrarias; UNM), por las recomendaciones brindadas durante las actividades en el campo de la biología molecular.

A la Dra. Gloria Monterubbianesi (Fac. de Cs. Agrarias; UNMdP), por asesorarme en el análisis estadístico, brindándome siempre un trato amable e incentivándome a jugar e innovar con los datos.

Al Sr. Juan Espinillo (INTA; Balcarce), que me asistió en tareas de laboratorio.

Al personal del Edificio de Propapa de la EEA del INTA de Balcarce, en especial a la Dra. Cecilia Bedogni y al Dr. Marcelo Huarte que me abrieron las puertas de su lugar de trabajo y me apoyaron en el transcurso de mis estudios.

A los queridos amigos que el Laboratorio de Genética me entregó, Gabriela, Anabela, Silvina, Sofía, Débora, Pía y Federico, por las risas, los consejos, el aliento y, sobre todo, el cariño.

A mis compañeras de trabajo de la Cátedra de Botánica Agrícola (Fac. de Cs. Agrarias; UNMdP), Marisa, Bochi, Verónica, Gabriela, Patricia, Eugenia y Evangelina, por comprender el esfuerzo y acompañarme.

A mis amigos “del cole”, compañeros de los viajes diarios, con quienes comparto motivaciones y alegrías.

A mis amigos de toda la vida, que me acompañan y alientan siempre.

A mis padres y hermanas que creen en mí y me acompañan en cada etapa de la vida con su infinito cariño.

A Joaquín, mi compañero de vida, que supo comprender ausencias y postergaciones, y me brindó apoyo, consuelo y amor.

A todos aquellos que de una u otra forma me brindaron su desinteresada colaboración e hicieron posible la realización de este trabajo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMEN.....	xx
ABSTRACT	xxii
ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	xxiv
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. Importancia de la producción y uso de especies nativas de valor ornamental ..	1
1.2. Caracterización y evaluación de RR.FF.	2
1.3. <i>Chrysoleaena flexuosa</i> (Sims) H. Rob.	3
1.4. Objetivos	5
2. CAPÍTULO I	
Caracterización fenotípica de introducciones de <i>Chrysoleaena flexuosa</i> (Sims) H.	
Rob. de la Argentina	7
2.1. Resumen	7
2.2. Introducción	8
2.3. Materiales y métodos.....	10
2.3.1. Material vegetal	10
2.3.2. Métodos	12
2.3.3. Caracterización de las condiciones ambientales de cada ciclo de crecimiento	13
2.3.4. Caracterización fenológica	14
2.3.5. Evaluación de caracteres morfológicos de interés ornamental	14
2.3.6. Tamaño del xilopodio	16
2.3.7. Daños por plagas y/o patógenos	17
2.3.8. Análisis de datos	17
2.3.8.1. Análisis de tipo univariado	17
2.3.8.2. Análisis multivariado de ordenación	18
2.4. Resultados.....	18
2.4.1. Caracterización de las condiciones ambientales de cada ciclo de crecimiento	18
2.4.2. Fenología	21
2.4.3. Análisis de caracteres morfológicos cuantitativos en dos ciclo de crecimiento	24

2.4.3.1. Número de hojas	24
2.4.3.2. Número de varas florales	27
2.4.3.3. Número de capítulos por vara floral	28
2.4.3.4. Número de ramas por vara floral	29
2.4.3.5. Altura de la vara floral	30
2.4.3.6. Relación entre la longitud y el ancho de la hoja más larga	32
2.4.3.7. Diámetro del capítulo central	34
2.4.3.8. Análisis multivariado de ordenación	35
2.4.3.9. Tamaño de xilopodio	37
2.4.3.10. Daños por plagas y/o patógenos	37
2.5. Discusión	38
2.5.1. Fenología	38
2.5.2. Caracterización morfológica	40
2.6. Conclusiones	43
3. CAPÍTULO II	
Números cromosómicos, contenido de ADN, anomalías meióticas y formación de polen $2n$ en introducciones de la especie silvestre <i>Chrysolaena flexuosa</i> (Sims) H. Rob. (Vernonieae, Compositae) de la Argentina	44
3.1. Resumen	44
3.2. Introducción	45
3.3. Materiales y métodos	47
3.3.1. Material vegetal	47
3.3.2. Números cromosómicos	48
3.3.3. Estimación del nivel de ploidía por citometría de flujo	49
3.3.4. Viabilidad y tamaño del polen	50
3.3.5. Análisis meiótico	50
3.4. Resultados	51
3.4.1. Números cromosómicos	51
3.4.2. Estimación del nivel de ploidía por citometría de flujo	52
3.4.3. Viabilidad y tamaño del polen	53
3.4.4. Análisis meiótico	56
3.5. Discusión	57
3.5.1. Números de cromosomas, niveles de ploidía y contenido de ADN	57
3.5.2. Viabilidad del polen	59
3.5.3. Comportamiento meiótico	60

ÍNDICE DE TABLAS

<p>Tabla 2.1. Origen geográfico de las introducciones de <i>Chrysoleaena flexuosa</i> de la Argentina e información sobre los ejemplares de referencia depositados en el Herbario BAL.</p> <p style="margin-left: 20px;"><i>Ref.</i>: Coleccionistas de las introducciones: Alo = Alonso, S.I.; Ech = Echeverría, M.L.; Nu = Nuciari, M.C.; VdP = Via do Pico, G.; D = Dematteis, M.; F = Farco, G.; V = Vega, A.</p>	11
<p>Tabla 2.2. Caracteres morfológicos cuantitativos empleados para la evaluación de las siete introducciones de <i>Chrysoleaena flexuosa</i> de la Argentina en dos ciclos de crecimiento</p>	15
<p>Tabla 2.3. Estimadores de efectos aleatorios referidos como BLUP en relación a la media gral. y la probabilidad asociada a cada valor de z (p-valor) para siete caracteres de valor ornamental en siete introducciones de <i>Ch. flexuosa</i> ..</p>	27
<p>Tabla 3.1. Números cromosómicos y contenido medio de 2C ADN de siete introducciones de <i>Chrysoleaena flexuosa</i> de la Argentina.</p> <p style="margin-left: 20px;"><i>Nota</i>: el número de plantas analizadas para determinar el número de cromosomas se indica entre paréntesis. Las introducciones con letras diferentes tienen contenidos medios de 2C ADN o de 1Cx significativamente diferentes entre sí ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$, respectivamente). D.E.: desvío estándar.</p>	52
<p>Tabla 3.2. Porcentaje de tríadas y tétradas durante estadio de tétrada en meiosis en plantas individuales (genotipos) de siete introducciones argentinas de <i>Chrysoleaena flexuosa</i></p>	56
<p>Tabla 4.1. Origen geográfico de siete introducciones de <i>Chrysoleaena flexuosa</i> de la Argentina, ploidía e información sobre los ejemplares de referencia depositados en el Herbario BAL.</p> <p style="margin-left: 20px;"><i>Ref.</i>: Coleccionistas de las introducciones: Alo = Alonso, S.I.; Ech = Echeverría, M.L.; Nu = Nuciari, M.C.; VdP = Via do Pico, G.; D = Dematteis, M.; F = Farco, G.; V = Vega, A.</p>	68

- Tabla 4.2. Caracteres morfológicos evaluados en introducciones de *Chrysolaena flexuosa* de la Argentina, incluyendo estadio fenológico en el momento de medición, denominación, abreviatura y unidades/escalas utilizadas 69
- Tabla 4.3. Valores medios y coeficientes de variación (CV) de 26 caracteres morfológicos registrados en siete introducciones de *Chrysolaena flexuosa* de la Argentina.
Ref.: Provincia de Buenos Aires: AloEch 1, AloEch 2, AloEch 3, Nu 1; Provincia de Entre Ríos: VdPDFV 14; Provincia de Corrientes: VdPDFV 45; Provincia de Misiones: VdPDFV 26. Abreviaturas: número de hojas ciclo 1 y 2 (NH1 y NH2), longitud de la hoja más larga ciclo 1 y 2 (LH1 y LH2), ancho de la hoja más larga ciclo 1 y 2 (AH1 y AH2), diámetro del capítulo principal ciclo 1 y 2 (DC1 y DC2), altura del capítulo principal ciclo 1 y 2 (AC1 y AC2), número de varas ciclo 1 y 2 (NV1 y NV2); número de ramas ciclo 1 y 2 (NR1 y NR2); número de capítulos ciclo 1 y 2 (NC1 y NC2); número de varas ciclo 1 y 2 (NV1 y NV2), longitud promedio de tres corolas ciclo 1 y 2 (LC1 y LC2), longitud de la hoja más larga en fructificación (LHF), ancho de la hoja más larga en fructificación (AHF), número de hojas en fructificación (NHF) 76
- Tabla 4.4. AMOVA basado en datos de marcadores AFLP de siete introducciones de *Chrysolaena flexuosa* de la Argentina 79

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 2.1. Distribución geográfica de las siete introducciones silvestres de *Chrysoleaena flexuosa* de la Argentina estudiadas.
- Nota: las provincias de Misiones (MI), Corrientes (CO), Entre Ríos (ER) y Buenos Aires (BA) se encuentran delimitadas por línea de puntos 11
- Figura 2.2. Sucesivas etapas del ensayo de evaluación de siete introducciones de *Chrysoleaena flexuosa* de la Argentina. a: germinación de semillas en placas de Petri; b: plántulas trasplantadas en bandejas plantineras; c: plantas trasplantadas en macetas individuales; d: plantas en macetas cultivadas al aire libre 13
- Figura 2.3. Sub-estadios del estadio reproductivo en *Chrysoleaena flexuosa*. a: botón floral; b: floración; c: fructificación plena 14
- Figura 2.4. Ejemplar adulto de *Chrysoleaena flexuosa* en pre-antesis con indicación de algunos caracteres morfológicos cuantitativos registrados en siete introducciones silvestres de la Argentina en dos ciclos de crecimiento.
- Ref.: AV: altura de la vara floral principal; DC: diámetro del capítulo principal en antesis 15
- Figura 2.5. Evolución del fotoperíodo a lo largo del año para la localidad de Balcarce, provincia de Buenos Aires.
- Nota: elaborado en base al “Programa para el cálculo de parámetros astronómicos” de la cátedra de Climatología y Fenología Agrícola de la Facultad de Agronomía de la UBA (FAUBA, 2017) 18
- Figura 2.6. Temperatura media mensual (° C) para el promedio histórico de la serie 2005/2014 y para los ciclos de crecimiento 1 (2012/13) y 2 (2013/14) en la UIB, provincia de Buenos Aires. 19

Figura 2.7. Precipitación mensual acumulada (mm) para el promedio histórico de la serie 2005/2014 y para los ciclos de crecimiento 1 (2012/13) y 2 (2013/14) en la UIB, provincia de Buenos Aires.

Nota: elaborado en base a los registros suministrados por el Servicio de Agrometeorología de la EEA del INTA de Balcarce, provincia de Buenos Aires ... 20

Figura 2.8. Evapotranspiración potencial media mensual (mm) para el promedio histórico de la serie 2005/2014 y para los ciclos de crecimiento 1 (2012/13) y 2 (2013/14) en la UIB, provincia de Buenos Aires.

Nota: elaborado en base a los registros suministrados por el Servicio de Agrometeorología de la EEA del INTA de Balcarce, provincia de Buenos Aires ..21

Figura 2.9. Porcentaje de plantas de siete introducciones de *Chrysolepta flexuosa* que alcanzaron la etapa reproductiva en los ciclos de cultivo 1 (2012/2013) y 2 (2013/2014) en la UIB, provincia de Buenos Aires 22

Figura 2.10. Representación esquemática del inicio de la etapa reproductiva de siete introducciones de *Chrysolepta flexuosa* en Balcarce, provincia de Buenos Aires, en los ciclos de crecimiento 1 (2012/2013) y 2 (2013/2014).

Nota: los extremos anterior y posterior de cada línea señalan el momento de inicio de cada sub-estado de la etapa reproductiva en la primera y la última planta, respectivamente. Línea gris= botón floral; línea blanca: floración; línea negra= fructificación; triángulo= período de máxima floración 23

Figura 2.11. Duración en días de la etapa reproductiva de siete introducciones de *Chrysolepta flexuosa* en Balcarce, provincia de Buenos Aires, en los ciclos de crecimiento 1 (2012/2013) y 2 (2013/2014).

Ref.: caja= 50% de los datos centrales; línea dentro de caja= mediana; punto dentro de caja= media; puntos fuera de la caja= valores extremos 24

Figura 2.12. Diagramas de caja para cuatro variables cuantitativas registradas en dos ciclos de cultivo en siete introducciones de *Chrysoleaena flexuosa*.

Ref.: caja= 50% de los datos centrales; línea dentro de caja= mediana; punto dentro de caja= media; puntos fuera de la caja= valores atípicos.; línea punteada que atraviesa cada ciclo de crecimiento= promedio general. Abreviaturas: NHF, número de hojas; NV, número de varas florales; NC, número de capítulos NR, número de ramas por vara floral principal 26

Figura 2.13. Diagramas de caja para cuatro variables cuantitativas registradas en dos ciclos de cultivo en siete introducciones de *Chrysoleaena flexuosa*.

Ref.: caja= 50% de los datos centrales; línea dentro de caja= mediana; punto dentro de caja= media; puntos fuera de la caja= valores atípicos.; línea punteada que atraviesa cada ciclo de crecimiento= promedio general. Abreviaturas: AV: altura de la vara floral principal; RLAF: relación entre el largo y el ancho de la hoja más larga en floración; DCC, diámetro del capítulo central 31

Figura 2.14. Ejemplares de *Chrysoleaena flexuosa* al final de la fructificación, procedentes de siete introducciones del centro este (a: AloEch 2; b: AloEch 3; c: Nu 1; d: AloEch 1) y del noreste argentino (e: VdPDFV 14; f: VdPDFV 45; g: VdPDFV 26) en su segundo ciclo de crecimiento en la UIB, partido de Balcarce, provincia de Buenos Aires 33

Figura 2.15. Ancho foliar medio de la hoja más larga (cm) de siete introducciones argentinas de *Chrysoleaena flexuosa* registrado en dos ciclos de cultivo en la UIB, partido de Balcarce, provincia de Buenos Aires.

Nota: las barras señalan desvío estándar 33

Figura 2.16. Capítulos de *Chrysoleaena flexuosa* de siete introducciones de la Argentina cultivadas en la UIB, partido de Balcarce, provincia de Buenos Aires 35

Figura 2.17. Longitud media de la corola (mm) de siete introducciones argentinas de *Chrysoleaena flexuosa* registradas en dos ciclos de crecimiento en la UIB, partido de Balcarce, provincia de Buenos Aires.

Nota: las estimaciones se obtuvieron a partir del promedio de la longitud de tres corolas tomadas al azar por cada planta. Las barras señalan desvío estándar 35

Figura 2.18. Análisis de ordenación a partir de Componentes Principales sobre matriz de correlación en base a 14 caracteres morfológicos. Representación de 83 individuos pertenecientes a siete introducciones de *Chrysoleaena flexuosa* de la Argentina sobre los dos primeros componentes principales, CP1 y CP2, respectivamente.

Ref.: ■: VdPDFV 26; ●: VdPDFV 45; △: VdPDFV 14; ●: AloEch 1; ★: AloEch 2;
 ■: AloEch 3; ▲: Nu 1

Nota: aporte de los dos primeros componentes: 27,74 y 13,87%,
 respectivamente36

Figura 2.19. Xilopodio de una planta de *Chrysoleaena flexuosa* en estado vegetativo en dos ciclos de crecimiento en la UIB, partido de Balcarce, provincia de Buenos Aires. a-b: ciclo de crecimiento 1; c: ciclo de crecimiento 2.

Nota: barra vertical roja= 1 cm 37

Figura 2.20. Síntomas de plantas enfermas de *Chrysoleaena flexuosa*. a: tejido foliar necrosado y con manchas irregulares; b-c: manchas púrpuras en vara floral 38

Figura 3.1. Inflorescencias de *Chrysoleaena flexuosa* con diferentes colores de flores: a) corolas blancas y pistilos lilas, b) corolas y pistilos de color lila, c) corolas de color púrpura oscuro y pistilos de color lila, d) corolas y pistilos blancos ... 46

Figura 3.2. Precipitación anual media (a) y temperatura (b) del área de distribución de *Chrysoleaena flexuosa* en Argentina y áreas geográficas adyacentes (adaptado de Mozo, 2016) 48

Figura 3.3. Histogramas de fluorescencia de núcleos aislados teñidos con IP en individuos de siete introducciones de *Chrysoleaena flexuosa* y un patrón interno. a) AloEch 1, b) AloEch 2, c) AloEche 3, d) Nu 1, e) VdPDFV 26, f) VdPDFV 14, g) VdPDFV 45 50

Figura 3.4. Metafases mitóticas en plantas de siete introducciones de *Chrysoleaena flexuosa*. a) AloEch 1 ($2n=6x=60$); b) AloEch 2 ($2n=6x=60$); c) AloEch 3 ($2n=6x=60$); d) Nu1 ($2n=6x=60$); e) VdPDFV 14 ($2n=4x=40$); f) VdPDFV 45 ($2n=2x=20$); g) VdPDFV 26 ($2n=2x=20$).

Ref.: barra de escala, 10 μm 51

Figura 3.5. Viabilidad del polen (%) en 15-21 plantas individuales de cada una de las siete introducciones de *Chrysoleaena flexuosa*.

Ref.: Caja = 50% de los datos centrales; línea dentro de la caja = mediana; puntos negros = media; punto blanco: valor atípico 53

Figura 3.6. Ejemplos de granos de polen viables (flechas llenas) e inviables (flechas vacías) en *Chrysoleaena flexuosa* de acuerdo con el tamaño. a) Normal (n) y pequeño (<n); b) normal (n) y pequeño (<n); c) normal (n) y 2n (>n).

Ref.: barra de escala, 20 μm 54

Figura 3.7. Valores medios de granos de polen viables (%) en siete introducciones de *Chrysoleaena flexuosa* discriminados en tres categorías según el tamaño: normal (n), 2n (>n) y pequeño (<n).

Nota: para cada introducción, el porcentaje de granos de polen viables en cada categoría se calculó promediando los porcentajes registrados (para la misma categoría) en 15-21 plantas individuales 55

Figura 3.8. Valores medios de granos de polen inviables (%) en siete introducciones de *Chrysoleaena flexuosa*, discriminados en cuatro categorías según tamaño y tipo de protoplasma: normal (n) y contraído, pequeño (<n) y contraído, normal y vacío, y pequeño (<n) y vacío.

Nota: para cada introducción, el porcentaje de granos de polen inviables en cada categoría se calculó promediando los porcentajes registrados (para la misma categoría) para 15-21 plantas individuales 55

Figura 3.9. Ejemplos de estadios de la meiosis en introducciones de *Chrysoleaena flexuosa*. a) Metafase I normal; b) cromosoma rezagado en Metafase I (flecha); c) fin de Anafase I normal; d) puente cromosómico en Anafase I (flecha); e) Metafase II normal; f) Metafase II anormal (flecha); g) husos paralelos en Metafase II; h) Metafase II anormal con cromosomas rezagados (flechas); i) fin de Anafase II normal; j) Telofase II normal; k) Telofase II anormal con un grupo de cromosomas grande y otros dos pequeños; l) una tétrada normal y otra tétrada con citomixis (flecha) en estadio de tétrada; m) tríada en la etapa de tétrada; n) tríada (flecha) y tétradas con disposición anormal en estadio de tétrada; o) tétrada en estadio de tétrada; p) tríada.

Ref.: barra de escala, 20 μm 57

Figura 4.1. Ejemplar adulto de *Chrysoleaena flexuosa* en pre-anteses con indicación de algunos caracteres morfológicos cuantitativos registrados en siete introducciones silvestres de la Argentina. a: capítulo en plena floración; b: corola.

Ref.: AV: altura de la primera vara floral; DC: diámetro del capítulo principal en plena floración; AC: altura del capítulo principal en plena floración; LC: longitud de la corola. Las flechas señalan los circinos o ramas florales 70

Figura 4.2. Caracteres cualitativos registrados en siete introducciones silvestres de *Chrysoleaena flexuosa* de la Argentina. a: corolas blancas; b: corolas rosadas; c: corolas lilas; d: corolas púrpuras; e: hojas con pelos ralos; f: hojas pubescentes; g: filarios verdes; h: filarios violáceos 71

Figura 4.3. Correlación entre 23 caracteres morfológicos registrados en 7 introducciones de *Chrysoleaena flexuosa* de la Argentina. Colores fríos señalan correlaciones positivas, colores cálidos señalan correlaciones negativas, ausencia de color señala ausencia de correlación. La correlación aumenta con el diámetro de los círculos y la intensidad del color.

Ref.: número de hojas ciclo 1 y 2 (NH1 y NH2), longitud de la hoja más larga ciclo 1 y 2 (LH1 y LH2), ancho de la hoja más larga ciclo 1 y 2 (AH1 y AH2), diámetro del capítulo principal ciclo 1 y 2 (DC1 y DC2), altura del capítulo principal ciclo 1 y 2 (AC1 y AC2), número de varas ciclo 1 y 2 (NV1 y NV2); número de ramas ciclo 1 y 2 (NR1 y NR2); número de capítulos ciclo 1 y 2 (NC1 y NC2); número de varas ciclo 1 y 2 (NV1 y NV2), longitud promedio de tres corolas ciclo 1 y 2 (LC1 y LC2), longitud de la hoja más larga en fructificación (LHF), ancho de la hoja más larga en fructificación (AHF), número de hojas en fructificación (NHF) 75

Figura 4.4. Análisis Factorial de Correspondencia Simple de siete introducciones de *Chrysoleaena flexuosa* de la Argentina, en base al nivel de ploidía y tres caracteres morfológicos cualitativos: pubescencia del follaje, color de los filarios, color de la corola 77

Figura 4.5. Análisis de Coordenadas Principales sobre matriz de similitud general de Gower, en base a datos combinados de ploidía y 26 caracteres morfológicos. Representación de 73 individuos pertenecientes a siete introducciones de *Chrysoleaena flexuosa* de la Argentina sobre dos primeras coordenadas principales.

Ref.: ■: VdPDFV 26; ●: VdPDFV 45; △: VdPDFV 14; ●: AloEch 1; ★: AloEch 2;
 ■: AloEch 3; ▲: Nu 1

Nota: aporte de las tres primeras coordenadas: 50,02; 15,95; 9,61 %, respectivamente 78

Figura 4.6. Análisis molecular de 73 individuos pertenecientes a siete introducciones de *Chrysoleuca flexuosa* de la Argentina basado en valores por individuo de 256 bandas polimórficas de marcadores AFLP. A. Dendrograma por método de UPGMA basado en el coeficiente de similitud de Jaccard. B. Análisis de Coordenadas Principales.

Ref.: ■: VdPDFV 26; ●: VdPDFV 45; △: VdPDFV 14; ●: AloEch 1; ★: AloEch 2;
■: AloEch 3; ▲: Nu 1.

Nota: aporte total de las tres primeras coordenadas principales: 20,7% 80

Figura 4.7. Análisis de Coordenadas Principales en base a datos combinados de ploidía, 26 caracteres morfológicos y 256 bandas polimórficas, obtenidas a partir de marcadores de AFLP, de 73 individuos pertenecientes a siete introducciones de *Chrysoleuca flexuosa* de la Argentina.

Ref.: ■: VdPDFV 26; ●: VdPDFV 45; △: VdPDFV 14; ●: AloEch 1; ★: AloEch 2;
■: AloEch 3; ▲: Nu 1 82

RESUMEN

Chrysolaena flexuosa (Sims) H. Rob. (Asteraceae, Vernoniaeae) es una especie nativa de Sudamérica que se distribuye desde el centro-sur de Brasil hasta el centro-este de la Argentina y posee como número básico de cromosomas $x=10$. Para el área principal de su distribución fueron reportados citotipos diploides ($2n=2x=20$) y tetraploides ($2n=4x=40$); mientras que para el área más austral –provincia de Buenos Aires, Argentina- sólo se dispone de un registro correspondiente a un citotipo hexaploide ($n=30-32$ ca.). Esta especie es un subfrutice con xilopodio que emite varas florales con llamativos capítulos de flores blancas a púrpuras, por lo que posee valor ornamental potencial. Para su eventual incorporación en programas de mejoramiento genético con miras a la obtención de cultivares, resulta necesario contar con variabilidad genética para caracteres morfológicos de valor ornamental. Sin embargo, no se dispone de información de este tipo que facilite el trabajo de los fitomejoradores. Consecuentemente, en el siguiente trabajo se realizó una caracterización fenotípica, citogenética y molecular de poblaciones naturales de *Ch. flexuosa* provenientes del área de distribución en la Argentina para investigar si: (1) poseen variabilidad genética; (2) la ploidía y la latitud se relacionan positivamente; (3) la poliploidización sexual puede haber sido instrumental en el origen de los citotipos poliploides. A partir de semillas de siete introducciones (muestras poblacionales) de *Ch. flexuosa*, procedentes de las provincias de Buenos Aires (cuatro), Entre Ríos (una), Corrientes (una) y Misiones (una), se obtuvieron plantas que fueron llevadas al aire libre en un lote en Balcarce, (sudeste de la Pcia. de Buenos Aires, Argentina), bajo un DBCA ($n=4$; 15-24 plantas/introducción). En ellas se registró la fenología y 26 caracteres cuali- y cuantitativos de valor ornamental, en dos ciclos de crecimiento: período 2012/13 (ciclo 1) y período 2013/14 (ciclo 2). Para la obtención de los caracteres moleculares se emplearon marcadores de tipo AFLP. También se determinó el número cromosómico, contenido de ADN, y tamaño y viabilidad de polen, y se analizó la microesporogénesis en una muestra de las poblaciones. Con los datos recabados se realizaron análisis de tipo univariado empleando modelos lineales mixtos. A su vez, se realizaron análisis multivariados y AMOVA, y se empleó el índice F_{st} de Wright para evaluar la diversidad genética de las introducciones. El porcentaje de plantas en flor fue mayor en el ciclo 2 que en el ciclo 1. A su vez, el período de floración promedio fue más corto en este segundo ciclo (66,8 vs. 72,6 días, respectivamente), y ocurrió anticipadamente con respecto al primer ciclo (octubre–marzo vs. enero-mayo, respectivamente). En la caracterización morfológica se detectó variabilidad inter- e intrapoblacional para las variables evaluadas. Algunos caracteres exhibieron interacción introducción \times ambiente. En todas las introducciones aumentó el número de hojas y de varas florales en ciclo 2. Las introducciones más australes -procedentes de Buenos Aires- presentaron, en general, menor número de hojas, de varas florales y de capítulos que las del NE, así como hojas y capítulos más grandes. Con respecto a la caracterización citogenética, las

introducciones del NE resultaron diploides y tetraploides; mientras que las introducciones más australes resultaron hexaploides. El nivel de ploidía determinado a partir de conteos cromosómicos coincidió con lo obtenido mediante citometría de flujo; y se observó que el tamaño genómico se redujo significativamente con la ploidía. Todas las introducciones presentaron variabilidad en viabilidad y tamaño de polen, así como producción de granos de polen grandes (presumiblemente polen $2n$). Esta variabilidad fue acompañada por eventos citológicos anormales en meiosis y en el estadio de tétrada. Por otra parte, el análisis multivariado conjunto de caracteres morfológicos y ploidía diferenció las introducciones en tres grupos: (1) Buenos Aires, (2) Entre Ríos, y (3) Corrientes y Misiones. El análisis multivariado combinando caracteres morfológicos, moleculares y ploidía sustentó la separación de las introducciones en función del origen geográfico, aunque de forma menos marcada. A su vez, los genotipos diploides presentaron menor tamaño de órganos que los poliploides. En el AMOVA las diferencias entre regiones geográficas no resultaron significativas ($p=0,123$) y el mayor porcentaje de la varianza molecular correspondió a la variación intrapoblacional (88,1%). El índice $F_{st}=0,11$ indicó moderada diferenciación genética entre introducciones. El mayor porcentaje de plantas en flor y la aceleración de la floración en el ciclo 2 estarían influenciados por el mayor desarrollo de las plantas y consecuente aumento de la concentración de sacarosa, que favorecerían la respuesta a las señales inductoras de la floración. El aumento en el número de hojas y de varas florales en ciclo 2 se relacionó con el aumento del tamaño del xilopodio que presentó más yemas que en el ciclo 1. Otros caracteres, como número de capítulos y de ramas, mostraron comportamiento de tipo cualitativo. Los resultados indican que, aparentemente, la ploidía y la latitud estarían relacionados, y que la poliploidización sexual puede haber sido instrumental en el origen, establecimiento y expansión de las poblaciones de *Ch. flexuosa*. A pesar de que algunos caracteres morfológicos resultaron exclusivos para cada introducción (posiblemente debido a fijación de alelos), la proximidad entre poblaciones facilitaría el flujo génico entre las mismas, con el intercambio interpoblacional de alelos. Por otra parte, la técnica AFLP resultó apropiada para la detección de variabilidad genética en las introducciones analizadas. Para concluir, la detección de variabilidad morfológica, citogenética y molecular en las introducciones estudiadas permitirían incorporar este germoplasma en programas de mejoramiento genético con fines ornamentales con buenas probabilidades de éxito en la obtención de cultivares comerciales. Además, la gran variabilidad morfológica detectada pone de manifiesto la importancia de observar un número representativo de plantas por población al realizar descripciones de esta especie, ya que los valores extremos observados supera en mucho los informados en la literatura.

Palabras clave: germoplasma nativo, floricultura, mejoramiento genético, evaluación, ploidía, gametos $2n$, AFLP, interacción introducción \times ambiente

ABSTRACT

Chrysolea flexuosa (Sims) H. Rob. (Asteraceae, Vernonieae) is a South American species, with a basic chromosome number of $x=10$. Natural populations of this species have been found from southern Brazil to central Argentina, being Buenos Aires province the southern limit of its distribution. Diploid ($2n=2x=20$) and tetraploid ($2n=4x=40$) cytotypes have been reported for its distribution area, although one hexaploid ($n=30-32$ ca.) cytotype has been reported for its most southern distribution. It is a perennial xylopodial wild herb, with an atypical inflorescence with a zig-zag branching pattern and a palette of flower colors, from pure white to deep purple, of potential ornamental value. To incorporate this species in breeding programs for developing commercial cultivars, it is necessary to count with genetic variability for morphological characters of ornamental value. However, no information is available on this regard to facilitate the plant breeders's activities. Consequently, in the following study, a phenotypic, cytogenetic and molecular characterization of natural populations of *Ch. flexuosa* from its distribution area in Argentina was carried out to investigate if (1): they were genetically variable; (2) ploidy and latitude were positively related; and (3) sexual polyploidization could have been instrumental in the origin of the polyploid cytotypes. Potted plants obtained from seeds of seven accessions (population samples), from the provinces of Buenos Aires (four), Entre Ríos (one), Corrientes (one), and Misiones (one), were grown outdoors in Balcarce, (Buenos Aires province, Argentina), under a CRBD ($n=4$, 15-24 plants/accession). Phenology and 26 qualitative and quantitative characters of ornamental value were recorded in two growth cycles: growing periods 2012/13 (cycle 1) and 2013/14 (cycle 2). AFLP markers were used for the molecular characterization. Chromosome numbers, DNA content, and pollen size and viability were also determined, and microsporogenesis was analyzed in a sample of each accession. Statistical analyses were performed, both univariate, using mixed linear models, and multivariate. Also an AMOVA was carried out and Wright's F_{st} index was used to evaluate the genetic diversity of the accessions. The percentage of flowering plants was higher in cycle 2 than in cycle 1. In turn, the average flowering period was shorter in this second cycle (66.8 vs. 72.6 days, respectively), and it occurred earlier than in the first cycle (October-March vs. January-May, respectively). In the morphological characterization, inter- and intrapopulation variability was detected. For some characters, introduction \times environment interactions were detected. In all accessions, the number of leaves and inflorescences increased in cycle 2. The most southern accessions –from Buenos Aires province- had fewer leaves, inflorescences and heads than those from the NE, as well as larger leaves and heads. Regarding the cytogenetic characterization, accessions from Corrientes and Misiones were diploid, the one from Entre Ríos was tetraploid, and those from Buenos Aires were hexaploid. Ploidy levels determined both by chromosome counting and flow cytometry coincided, although the monoploid genome size significantly decreased with

increasing ploidy. In all accessions, variability was observed for pollen viability and size, as well as for large (presumably 2n) pollen production. This variability was underlined by abnormal cytological events in meiosis and at the tetrad stage.

On the other hand, multivariate analysis using morphological characters and ploidy level differentiated the accessions into three groups: (1) Buenos Aires, (2) Entre Ríos, and (3) Corrientes and Misiones. The multivariate analysis combining ploidy levels and morphological and molecular characters supported less markedly the separation of accessions according to geographical origin. In turn, diploid genotypes had smaller organ size than polyploids. In the AMOVA, the differences among geographic origin were not significant ($p = 0.123$) and the highest percentage of the molecular variance corresponded to intrapopulation variation (88.1%). The $F_{st} = 0.11$ index indicated moderate genetic differentiation between introductions. The higher percentage of flowering plants and the acceleration of the flowering period in cycle 2 would be influenced by the greater development of the plants and the consequent increase in sucrose concentration, which favored the response to flower induction. The increase in the number of leaves and inflorescences in cycle 2 was related to the increase in the size of the xylopodium, which presented more buds than in cycle 1. Other characters, such as number of capitulum and branches, exhibited qualitative behavior. The results would indicate that there is, apparently, a positive relation between ploidy and latitude, and suggest a likely role of sexual polyploidization in the origin, establishment and expansion of *Ch. flexuosa* populations. Although some morphological characters were exclusive for each introduction (possibly due to allele fixation), proximity between populations would facilitate gene flow between them, and interpopulation allele exchange. On the other hand, the AFLP technique was appropriate for detecting genetic variability in the analyzed accessions. To conclude, the detection of morphological, cytogenetic and molecular variability in the analyzed accessions would allow the incorporation of this germplasm in breeding programs with ornamental purposes, with good expectations of success in obtaining commercial cultivars. In addition, the large morphological variability detected highlights the importance of observing a representative number of plants per population when making descriptions of this species, since the extreme values observed do not coincide with those reported in the literature.

Keywords: native germplasm, floriculture, genetic improvement, evaluation, ploidy, 2n gametes, AFLP, interaction introduction × environment

ABREVIATURAS Y SIGLAS

1Cx: tamaño del genoma

2C ADN: contenido de ADN nuclear

AFLP: polimorfismos para la longitud de fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

AMOVA: análisis de la varianza molecular (*Analysis of molecular variance*)

ANOVA: análisis de la varianza

BAL: herbario de la Unidad Integrada Balcarce

BLUP: mejor predictor lineal insesgado (*Best Linear Unbiased Estimator*)

ACP: Análisis de Componentes Principales

A.Coor.P.: Análisis de Coordenadas Principales

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

CV: coeficiente de variación

D.E.: desvío estándar

ETP: evapotranspiración potencial

IBONE: Instituto de Botánica del Nordeste

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

IP: yoduro de propidio

NE: noreste

NEA: noreste de la Argentina

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

RR.FF.: recursos fitogenéticos

UIB: Unidad Integrada Balcarce: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria -
Facultad de Ciencias Agrarias

UPGMA: Método de agrupamiento con promedios aritméticos (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*)

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Importancia de la producción y uso de especies nativas de valor ornamental

La floricultura es una actividad que se encuentra en expansión y la demanda de nuevos cultivos ornamentales es creciente, tanto en el mercado local como en el internacional (INTEA, 2003; INTA Informa 2017). Así mismo, los cultivos ornamentales son reconocidos como una parte vital del patrimonio natural mundial (Datta y Chakrabarty, 2016). En particular, en la República Argentina, las provincias de Corrientes, Córdoba y Buenos Aires son los principales centros productores de plantas ornamentales (Morisigue *et al.*, 2012; INTEA, 2003). En general, para obtener productos que posteriormente se ofrecen en el mercado floricultor, los productores argentinos deben recurrir al cultivo de materiales de propagación importados, es decir, a la utilización de variedades desarrolladas en ambientes distintos a los de las zonas de producción, y al pago de regalías a las empresas proveedoras extranjeras, lo que encarece los costos (INTA Informa, 2017).

Varias instituciones nacionales evalúan germoplasma nativo de valor ornamental potencial para considerar su incorporación en el mercado florícola y, gracias a ello, se comercializan en el mercado mundial cultivares comerciales de especies nativas pertenecientes a los géneros *Alstroemeria*, *Calibrachoa*, *Mercadonia*, *Glandularia* y *Petunia*, entre otros (INTA Informa, 2017). Debido a la extensión territorial y multiplicidad climática, en la Argentina crecen de forma espontánea 9.938 especies de plantas vasculares, de las cuales se estima que el 17,7% son endémicas (Zuloaga *et al.*, 1999). Por lo tanto, la inclusión de recursos fitogenéticos (RR.FF.) de origen nativo en el mercado floricultor podría representar una alternativa para satisfacer a productores y a consumidores. Entre los beneficios de la producción de estos RR.FF. por parte de los productores florícolas se pueden citar la reducción del costo de adquisición de los cultivares y el aumento en la oferta de cultivos novedosos. Entre los beneficios de la utilización de estos RR.FF. por los consumidores, en cambio, se encuentran principalmente la economización del mantenimiento y manejo de los espacios verdes y la posibilidad de recrear, al menos en parte, paisajes naturales (Burgueño y Nardini, 2009; INTA Informa, 2017). A su vez, la difusión y uso de plantas nativas en planteos

paisajísticos es una forma de dar a conocer dichos recursos y la importancia de su cuidado, convirtiéndose además en una estrategia de conservación y valoración de los mismos por parte de la comunidad.

1.2. Caracterización y evaluación de RR.FF.

Para incluir nuevas especies en el mercado floricultor e idear estrategias para su uso sostenible, resulta importante conocer aspectos básicos de la biología reproductiva y la variabilidad morfológica y genética natural de las mismas. Por lo tanto, ante la posibilidad de incorporar una especie candidato al mercado, surge la necesidad de caracterizar y evaluar previamente diversas poblaciones, actividades básicas de los programas de mejoramiento vegetal (Stroup, 2000). Dichas actividades deben estar orientadas al estudio de aquellos atributos vegetativos y/o reproductivos que posibiliten la selección de genotipos de alto valor ornamental.

La detección de variabilidad genética para uno o más caracteres de interés es el sustrato, la base o la condición de partida de la selección y del mejoramiento genético vegetal (Rimieri, 2017). El éxito de un plan de mejoramiento genético depende de la disponibilidad de variabilidad genética heredable para el (los) carácter(es) que se desea(n) mejorar. La detección de variabilidad permite seleccionar genotipos que serán empleados por el fitomejorador para la obtención de materiales que sean capaces de expresar varios caracteres deseables.

Dado que la caracterización morfológica de poblaciones naturales puede ser poco efectiva cuando la selección se basa en caracteres influidos por el ambiente, es necesario llevar a cabo ensayos diseñados que presenten repeticiones en diferentes ambientes. De esta forma se conducen ensayos comparativos en distintos ambientes para detectar la presencia de la interacción población \times ambiente o genotipo \times ambiente, es decir, respuestas poblacionales o genotípicas diferenciales en distintos ambientes (Cruz Medina, 1992; Kang y Gauch, 1996).

Los datos morfológicos proveen información práctica para caracterizar los RR.FF. y frecuentemente este tipo de información se complementa con datos citogenéticos y moleculares.

La utilización de marcadores moleculares en la caracterización y evaluación de RR.FF. permite estimar la diversidad genética presente en poblaciones y el grado de relación genética dentro de cada población y entre ellas. Los marcadores moleculares del ADN presentan características particulares como el hecho de no estar afectados por

el ambiente en que se desarrolla el organismo a evaluar. En plantas, estas técnicas brindan la posibilidad de trabajar con muestras extraídas de semilla o partes vegetativas en los primeros estadios de desarrollo, permitiendo acelerar generaciones en el proceso de mejoramiento vegetal (Nuez Viñals y Carrillo Becerril, 2000).

Entre los marcadores moleculares, los AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* o Polimorfismo para Longitud de Fragmentos Amplificados) presentan ventajas cuando se trabaja con especies o grupos de plantas para las cuales no se han desarrollado marcadores específicos, y permiten detectar polimorfismos en distintas plantas, siendo altamente reproducibles (Martínez *et al.*, 2010).

1.3. *Chrysolaena flexuosa* (Sims) H. Rob.

En el sudeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina, son numerosas las especies de la flora autóctona serrana con potencial ornamental, muchas de las cuales pertenecen a la familia Asteraceae (Alonso *et al.*, 2009).

En estudios realizados en dicha región, *Chrysolaena flexuosa* (Sims) H. Rob. (= *Vernonia flexuosa* Sims), perteneciente a la Tribu Vernonieae (Robinson, 1988a Dematteis, 2009; 2014), se destacó como promisorio para su cultivo en macetas (Echeverría *et al.*, 2012).

Esta especie, conocida como “quiebra arado”, “yerba del sudor” o “batata leñosa”, se distribuye en Sudamérica, desde el sur de Brasil hasta el centro sur de la Argentina. En este último país, el extremo sur del Sistema serrano de Tandilia, constituye el límite austral de la distribución de esta especie. De hecho *Ch. flexuosa* representa la especie de la Tribu Vernonieae con distribución más septentrional (Dematteis 2009; Dematteis *et al.*, 2017).

El número cromosómico básico de esta especie es $x=10$, habiéndose encontrado poblaciones diploides ($2n=2x=20$) y tetraploides ($2n=4x=40$) en Uruguay, Paraguay, sur de Brasil y Noreste de la Argentina (NEA) (Dematteis, 2009; Vía do Pico y Dematteis, 2012). A su vez, Hunziker *et al.* (1990), tras observar la meiosis en una muestra de la localidad de Tandil, provincia de Buenos Aires, informó para esta especie el número cromosómico gametofítico $n=30-32$ ca., aunque sin aclaración sobre el número de genotipos analizados para arribar a este resultado.

Las plantas de esta especie son sufrútices, erectos, de 40 a 80 cm de altura, que presentan xilopodio grueso. Presentan hojas con disposición alterna, contorno linear-elíptico a obovado-elíptico, de 5 a 14 cm de largo, y de 1 a 2,5 cm de ancho, laxamente

pubescentes a subglabras (Dematteis *et al.*, 2017). El follaje es caduco en invierno, y vegetan desde inicios de primavera hasta inicios del invierno. El desarrollo de la etapa reproductiva ocurre desde fines de primavera hasta mediados de otoño (Echeverría y Alonso, 2012), emitiendo varas florales con una a tres ramas o circinos terminales que sostienen capítulos sésiles o cortamente pedunculados, poco numerosos (Cabrera, 1963; Dematteis, 2009). En las revisiones bibliográficas del género *Chrysolaena*, anteriormente considerado como *Vernonia* (Cabrera, 1963; Dematteis, 2009), se reporta variabilidad para esta especie en tamaño de capítulos, involucro de 6-12 × 12-15 mm, y en color de las flores, pudiendo las mismas ser púrpuras, liláceas, rosadas o blancas (Cabrera, 1963; Dematteis, 2009; Dematteis *et al.*, 2017).

Los trabajos publicados sobre esta especie no han incluido, o lo han hecho muy someramente, la evaluación de poblaciones de zonas marginales australes, como es el Sistema serrano de Tandilia. Se desconoce, entonces, la variabilidad morfológica, genética y molecular de las poblaciones del SE bonaerense y las similitudes o diferencias que pudiera haber entre éstas y las poblaciones del NE del país.

Resumiendo, ensayos a campo que involucren al menos dos años de evaluación (año= ambiente) permiten detectar interacciones introducción × ambiente y, por lo tanto, observar la expresión de caracteres ornamentales de interés bajo distintas condiciones ambientales. Por otra parte, la caracterización molecular permite obtener información sobre la estructura genética de las poblaciones de una especie en estudio y, en consecuencia, establecer estrategias apropiadas de muestreo y conservación *ex situ* de la misma. Por lo tanto, estos resultados sumados a la caracterización citogenética permiten obtener información valiosa de potencial uso en programas de mejoramiento genético vegetal.

En la Unidad Integrada Balcarce se mantienen como colecciones de trabajo semillas de *Ch. flexuosa* provenientes de poblaciones de distintas sierras del Sistema de Tandilia, junto con otras de la zona central de su distribución (NEA) que fueron cedidas por investigadores del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE). A partir de lo expuesto se plantean las siguientes hipótesis de este trabajo:

En *Chrysoleaena flexuosa*, y para las poblaciones de la zona central (NEA) y de la zona marginal (Tandilia) que se mantienen como colecciones de trabajo en la Unidad Integrada Balcarce:

H1- Sólo las poblaciones de las sierras de Tandilia son hexaploides ($2n=6x=60$).

H2- Al ser cultivadas en el SE bonaerense durante dos ciclos de crecimiento (dos ambientes), las poblaciones de Tandilia y del NEA:

H2-1) se diferencian en uno o más de los siguientes caracteres morfológicos:

- 1.a) número de hojas
- 1.b) tamaño foliar
- 1.c) color de flor
- 1.d) tamaño de capítulos
- 1.e) número de capítulos por vara floral
- 1.f) altura de varas florales

H2-2) difieren en sus etapas fenológicas.

H3) La variabilidad morfológica presente entre y dentro de las poblaciones tiene base genética detectable mediante el uso de marcadores moleculares de AFLP.

1.4. Objetivos

Dado que la existencia de variabilidad en aquellos caracteres que pueden tener valor económico es requisito para encarar programas de mejoramiento genético, este trabajo de tesis tiene como objetivo general caracterizar morfológica, citogenética y molecularmente, en condiciones de cultivo al aire libre en la Unidad Integrada Balcarce (UIB) - 37° 45' 39,68" S; 58° 17' 59,42" O -, muestras de poblaciones naturales de *Chrysoleaena flexuosa* provenientes de la zona central de su distribución (NEA) y de la zona marginal austral (sierras del Sistema de Tandilia) que se mantienen como colecciones de trabajo para su eventual incorporación en el mercado viverista.

Para dichas poblaciones, los objetivos específicos son:

A nivel de planta individual

- 1- Determinar el número cromosómico somático.
- 2- Registrar tamaño, forma y viabilidad de los granos de polen. En caso de detectarse esterilidad, estudiar el comportamiento meiótico.
- 3- Estimar el contenido de ADN, tamaño genómico y nivel de ploidía mediante la técnica de citometría de flujo.

A nivel poblacional

- 4- Evaluar caracteres morfológicos vegetativos y reproductivos de interés ornamental, en dos años de cultivo, para generar información referida a la expresión de los mismos ante distintas condiciones ambientales e investigar interacciones población \times ambiente.
- 5- Registrar la duración de las etapas fenológicas, en dos años de cultivo, para evaluar dos períodos de crecimiento y dos ambientes dado que el mayor atractivo de esta especie se produce en la floración.
- 6- Evaluar los patrones electroforéticos para marcadores moleculares AFLP (polimorfismo de la longitud de fragmentos de ADN amplificados) a fin de obtener información sobre la estructura genética de las poblacionales muestreadas (bajo el supuesto de que, por la metodología aplicada, las muestras son representativas de la situación actual en los sitios de colección).
- 7- Comparar los datos de los caracteres morfológicos, citogenéticos y moleculares que se obtengan para hallar relaciones entre las poblaciones.

2. CAPÍTULO I

Caracterización fenotípica de introducciones de *Chrysolea flexuosa* (Sims) H. Rob. de la Argentina

2.1. Resumen

Chrysolea flexuosa es una especie sudamericana perenne de potencial valor ornamental. Para su eventual incorporación en programas de mejoramiento genético con miras a la obtención de cultivares, resulta necesario contar con variabilidad genética. Consecuentemente, el objetivo del siguiente trabajo fue realizar la caracterización fenotípica de introducciones provenientes del área de distribución en la Argentina, en el Pdo. de Balcarce, Pcia. de Buenos Aires. En siete introducciones se registró la fenología y ocho caracteres cuantitativos de valor ornamental, en dos ciclos de crecimiento: período 2012/13 (ciclo 1) y período 2013/14 (ciclo 2). Los datos se analizaron empleando análisis de componentes principales (ACP) y modelos lineales mixtos. El porcentaje de plantas en flor fue mayor en el ciclo 2. A su vez, el período de floración promedio fue más corto que en el ciclo 1 (66,8 vs. 72,6 días, respectivamente), y ocurrió anticipadamente (octubre-marzo vs. enero-mayo). El ACP separó a los individuos del norte de los del sur. En la caracterización morfológica se detectó variabilidad inter- e intrapoblacional para las variables evaluadas. Algunos caracteres exhibieron interacción introducción × ambiente. En todas las introducciones aumentó el número de hojas y de varas florales en el ciclo 2. Las introducciones más australes presentaron, en general, menor número de hojas, de varas florales y de capítulos que las del NE, y hojas y capítulos más grandes. El mayor porcentaje de plantas en flor y la aceleración de la floración en el ciclo 2 estarían influenciados por el mayor desarrollo de las plantas y consecuente aumento de la concentración de sacarosa, que favorecerían la respuesta a las señales inductoras de la floración. El aumento en el número de hojas y de varas florales en ciclo 2 se relacionó con el aumento del tamaño del xilopodio que presentó más yemas. Otros caracteres, como número de capítulos y de ramas, mostraron comportamiento de tipo cualitativo. La variabilidad morfológica detectada pone de manifiesto la importancia de observar un número representativo de plantas por población al realizar descripciones de *Ch. flexuosa* y constituye la base para iniciar un plan de mejoramiento de plantas ornamentales.

Palabras clave: evaluación, RR.FF., caracteres ornamentales, interacción introducción × ambiente, mejoramiento genético, fenología, floración, BLUPs.

2.2. Introducción

Chrysolaena flexuosa (Sims) H. Rob. (= *Vernonia flexuosa* Sims) es una especie perteneciente a la familia de las Asteraceae (Vernonieae) que se distribuye en Sudamérica, desde el sur de Brasil hasta el sur de la provincia de Buenos Aires. Las plantas de esta especie son subfrútices, erectos, con xilopodio grueso, que vegetan desde inicios de primavera hasta inicios de invierno y desarrollan la etapa reproductiva desde fines de primavera hasta mediados de otoño. Durante la floración emiten inflorescencias compuestas formadas por circinos terminales (Echeverría *et al.*, 2012; Dematteis, 2014). Las revisiones y descripciones taxonómicas y citogenéticas del género *Chrysolaena*, anteriormente considerado como *Vernonia* (Cabrera, 1963; Robinson, 1988a; Via do Pico y Dematteis, 2012; 2013; Dematteis, 2014), han incluido de forma somera la evaluación de poblaciones de esta especie oriundas de zonas marginales australes como lo es el Sistema serrano de Tandilia. Sin embargo, los capítulos presentan flores con el fenómeno de protandria (observación personal) y que son visitados por distintos polinizadores (Sabatino *et al.*, 2017) por lo que presentaría dos modos de reproducción: sexual por alogamia y asexual, vegetativa o agámica a partir de los xilopodios.

Debido a sus llamativas inflorescencias, tanto en plena floración como en fructificación, *Ch. flexuosa* se ha destacado como una especie promisoría para su cultivo en macetas, canteros o borduras en el primer caso, y para la creación de arreglos florales secos en el segundo (Echeverría *et al.*, 2012).

Para poder desarrollar cultivares comerciales con el fin de incluir nuevas especies en el mercado floricultor e idear estrategias para su uso sostenible, resulta importante generar información básica para emplear en un programa de mejoramiento genético vegetal. A grandes rasgos, la selección puede realizarse de forma masal, tomando aquellos genotipos de interés del conjunto general de individuos bajo análisis, o a partir de una serie de pasos que involucran la realización de cruzamientos dirigidos, análisis de la progenie y por último selección de el/los genotipo/os que reúna/n atributos deseables (Falconer, 1986; Fehr, 1987). Los avances en un programa de mejoramiento genético dependen de la variabilidad genética para uno o más caracteres de interés presente en los genotipos bajo análisis, siendo esta el sustrato, la base o la condición de partida del mejoramiento genético vegetal (Rimieri, 2017). La detección de variabilidad permitirá entonces la selección de genotipos que serán empleados por el

fitomejorador para la obtención de materiales que sean capaces de expresar caracteres deseables.

La diversidad genética es el componente principal de la diversidad biológica y debería estar representada en los Recursos Genéticos, *in situ* y *ex situ*, y en el genoma de las especies que deben protegerse y conservarse (Rimieri, 2017). Como Recursos Genéticos se consideran a las plantas y animales que poseen valor económico o utilitario actual o potencial para el ser humano (FAO, 2017). La diversidad de los recursos fitogenéticos (RR.FF.) es crucial para la humanidad ya que representa la materia prima para conseguir nuevas materiales de interés agronómico que permitan dar respuestas a los cambios y a las exigencias del ambiente y del mercado.

En los programas de mejoramiento vegetal, la caracterización y evaluación de los RR.FF. es una actividad básica (Stroup, 2000). En general se acepta que la caracterización tiene por objetivo identificar y describir las introducciones de germoplasma, mientras que la evaluación intenta dar a conocer el valor agronómico de dichos materiales, aunque la distinción entre ambas actividades es esencialmente de orden práctico (Abadie y Berretta, 2001). Así, ambas actividades sustentan la valorización de los RR.FF., la prioridad de su investigación y la continuidad de los programas de mejoramiento genético.

En ciertos casos, en la evaluación de RR.FF. así como en los programas de mejoramiento genético vegetal, la selección se basa en caracteres influidos por el ambiente, por lo que es necesario llevar a cabo ensayos diseñados que presenten repeticiones en diferentes ambientes, así como el análisis estadístico de los resultados. Por lo tanto, se conducen ensayos comparativos en distintos ambientes para detectar la presencia de la interacción población \times ambiente o genotipo \times ambiente, es decir, respuestas poblacionales o genotípicas diferenciales en distintos ambientes (Cruz Medina, 1992; Kang y Gauch, 1996). Conocer la estabilidad de los materiales resulta de gran importancia a la hora de decidir qué materiales emplear para cada escenario ambiental. Así, bajo el concepto de estabilidad biológica o estática se considera que un genotipo o introducción es estable si el desempeño del carácter en estudio exhibe mínimos o nulos cambios ante variaciones de las condiciones ambientales. Por otra parte, bajo el concepto de estabilidad agronómica se considera que un genotipo o introducción es estable cuando el desempeño del carácter se comporta de acuerdo a lo estimado o predicho por las condiciones ambientales (Becker, 1981). Por lo tanto, dependiendo del interés se tendrá en cuenta un concepto de estabilidad u otro para realizar las recomendaciones o sugerencias de cultivo y/o uso de determinado material.

En etapas tempranas de los programas de caracterización y/o evaluación de germoplasma, se utiliza material vegetal experimental perteneciente a distintas introducciones, con pocos datos de evaluación, por lo que pueden ser considerados como una colección aleatoria del material genético de interés. Por lo tanto, en los análisis estadísticos, los efectos de genotipos y/o de poblaciones pueden ser considerados como aleatorios, centrándose el análisis de los datos experimentales en el estudio de la variabilidad entre genotipos y/o de poblaciones y en la elección de genotipos y/o de poblaciones que deberán continuar en evaluación (Casanoves y Balzarini, 2002).

Dado que para *Ch. flexuosa* se desconoce la variabilidad morfológica de las poblaciones con distribución austral y las similitudes o diferencias que pudiera haber entre éstas y las poblaciones del NE argentino, el objetivo del presente trabajo fue realizar la caracterización fenológica y la evaluación de caracteres morfológicos de interés ornamental en introducciones argentinas de esta especie. Para esto, la evaluación se llevó a cabo en dos ciclos de crecimiento, es decir, bajo dos ambientes (año=ambiente) a fin de generar información referida a la expresión de dichos caracteres ante distintas condiciones ambientales y de permitir investigar interacciones introducción × ambiente. A su vez, los datos recabados se sometieron a un análisis de componentes principales a fin de indagar si los caracteres morfológicos cuantitativos pueden ser de utilidad para separar las introducciones de *Ch. flexuosa* analizadas en función de su origen geográfico.

2.3. Materiales y métodos

2.3.1. Material vegetal

Se utilizaron semillas de siete introducciones (muestras de poblaciones conservadas *ex situ*) de *Chrysolaena flexuosa* (Tabla 2.1). Las introducciones de las provincias de Misiones, Corrientes y Entre Ríos (Figura 2.1) fueron proporcionadas por el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), Argentina. Las de la provincia de Buenos Aires (Figura 2.1) fueron recolectados para este estudio y depositados en la Unidad Integrada Balcarce: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - Facultad de Ciencias Agrarias (UIB); Ruta Nacional 226 Km 73,5, Partido de Balcarce, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Las introducciones cubren el rango de distribución de la especie en Argentina, caracterizado por diferentes regímenes de temperatura y lluvia. Los ejemplares de referencia se depositaron en el herbario de la Unidad Integrada Balcarce (BAL).

Tabla 2.1. Origen geográfico de las introducciones de *Chrysolaena flexuosa* de la Argentina e información sobre los ejemplares de referencia depositados en el Herbario BAL.

Introducción	Localidad	Coordenadas geográficas	Voucher y N° de colección del herbario BAL
AloEch 1	Provincia de Buenos Aires, partido de Gral. Pueyrredón, Sierra de Los Padres	37° 34' 16" S; 57° 28' 04" O	Echeverría, M.L. 301; BAL No.: 8615
AloEch 2	Provincia de Buenos Aires, partido de Balcarce, Sierra La Barrosa	37° 53' 40" S; 58° 16' 14" O	Echeverría, M.L. 302; BAL No.: 8616
AloEch 3	Provincia de Buenos Aires, partido de Balcarce, Sierra La Chata	37° 52' 13" S; 58° 22' 40" O	Echeverría, M.L. 303; BAL No.: 8617
Nu 1	Provincia de Buenos Aires, partido de Balcarce, Sierra La Bachicha	37° 47' 52" S; 58° 08' 36" O	Echeverría, M.L. 304; BAL No.: 8618
VdPDFV 26	Provincia de Misiones, Dpto. Capital	27° 26' 47" S; 55° 54' 11" O	Echeverría, M.L. 305; BAL No.: 8619
VdPDFV 45	Provincia de Corrientes, Dpto. Itá Ibaté	27° 26' 47" S; 57° 20' 01" O	Echeverría, M.L. 306; BAL No.: 8620
VdPDFV 14	Provincia de Entre Ríos, Dpto. Federación	30° 42' 12" S; 58° 00' 40" O	Echeverría, M.L. 307; BAL No.: 8621

Ref.: Coleccionistas de las introducciones: Alo = Alonso, S.I.; Ech = Echeverría, M.L.; Nu = Nuciari, M.C.; VdP = Via do Pico, G.; D = Dematteis, M.; F = Farco, G.; V = Vega, A.

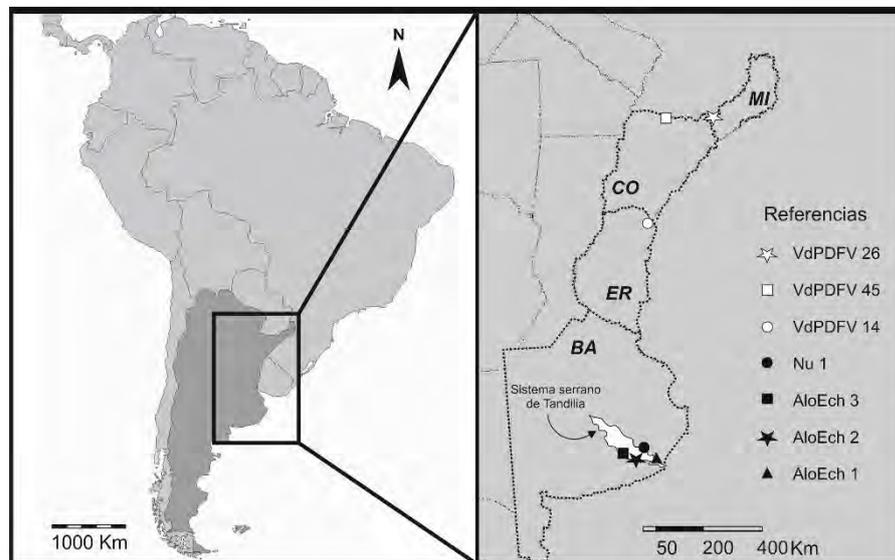


Figura 2.1. Distribución geográfica de las siete introducciones silvestres de *Chrysolaena flexuosa* de la Argentina estudiadas.

Nota: las provincias de Misiones (MI), Corrientes (CO), Entre Ríos (ER) y Buenos Aires (BA) se encuentran delimitadas por línea de puntos.

2.3.2. Métodos

El ensayo se desarrolló en el campo experimental de la UIB, (37° 45' S, 58° 18' O; 130 msnm) en tres etapas: 1-siembra en cámara de germinación, 2- trasplante en bandejas plantineras, y 3- cultivo al aire libre.

Las plantas fueron cultivadas a partir de semillas. La siembra se realizó el 23/03/2012 en cajas de Petri, mediante el sistema *top paper*, en cámara de germinación bajo un régimen de 16 h con luz a 30° C y 8 h en oscuridad a 20° C (Figura 2.2a). Cuando las plantas presentaron raíz seminal y cotiledones visible se trasplantaron a bandejas plantineras en invernáculo (Figura 2.2b). El sustrato base fue suelo esterilizado, turba y perlita (3:1:1, v/v/v). Cuando las plántulas presentaron al menos tres hojas verdaderas se trasplantaron a macetas individuales de 3 l, empleando el mismo sustrato que en la etapa de siembra en plantinera (Figura 2.2c). Durante la primavera, las macetas se colocaron al aire libre en un lote de la UIB, siguiendo un diseño en bloques completos aleatorizados (DBCA) con tres repeticiones (n=3). Las parcelas, cada una correspondiente a una introducción, estaban constituidas por dos hileras de cuatro plantas (ocho plantas/parcela). La distancia entre parcelas vecinas fue de 70 cm. A cada lado del ensayo se agregó una hilera adicional de plantas para disminuir los efectos de bordura del ensayo (Figura 2.2d).

El cultivo de las plantas se realizó durante dos ciclos de crecimiento sucesivos. El ciclo de crecimiento 1 abarcó el período 2012/13 (ciclo 1) mientras que el ciclo de crecimiento 2 abarcó el período 2013/14 (ciclo 2). Durante los dos ciclos de crecimiento se realizaron labores manuales de desmalezado. Además se realizaron riegos en los trasplantes y en los períodos de mayor déficit hídrico.

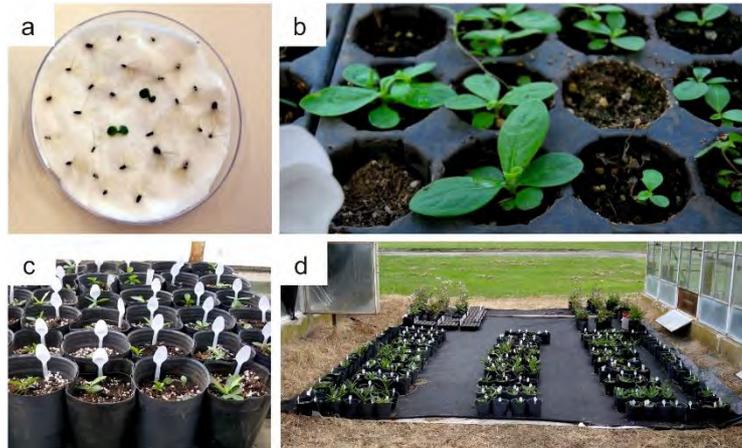


Figura 2.2. Sucesivas etapas del ensayo de evaluación de siete introducciones de *Chrysoleaena flexuosa* de la Argentina. a: germinación de semillas en placas de Petri; b: plántulas trasplantadas en bandejas plantineras; c: plantas trasplantadas en macetas individuales; d: plantas en macetas cultivadas al aire libre.

2.3.3. Caracterización de las condiciones ambientales de cada ciclo de crecimiento

Con el fin de caracterizar cada ambiente, es decir, cada ciclo de crecimiento bajo estudio, se construyó la curva de fotoperiodo típica de la localidad de Balcarce, donde se encuentra situada la UIB, y se estimaron las variables agroclimáticas temperatura, precipitación y evapotranspiración.

Para construir la curva de fotoperiodo de Balcarce se empleó el “Programa para el cálculo de parámetros astronómicos”, elaborado por la Cátedra de Climatología y Fenología Agrícola de la Facultad de Agronomía de la UBA (FAUBA, 2017).

Por otra parte, para obtener los registros de temperatura, precipitación y evapotranspiración potencial de los dos años en los cuales se realizaron las mediciones, se utilizaron los datos aportados por el Servicio de Agrometeorología de la Estación Meteorológica de la EEA del INTA de Balcarce. Con esta base de datos, se calculó también el promedio histórico de dichas variables para la serie 2005/2014. Con la información obtenida se elaboraron gráficos con los registros medios mensuales de cada variable.

2.3.4. Caracterización fenológica

Para establecer la fenología en cada ciclo de crecimiento se siguió la metodología de Echeverría y Alonso (2012). De esta forma se registraron, en todas las plantas, las fechas de tres sub-estadios del estadio reproductivo (Figura 2.3):

- botón floral: cuando la planta, tras emitir su vara floral, presenta todos los capítulos cerrados o en formación;
- floración: cuando la planta presenta al menos un capítulo abierto exhibiendo flores;
- fructificación plena: cuando la planta presenta todos los capítulos exhibiendo papus y/o diseminando los frutos.



Figura 2.3. Sub-estadios del estadio reproductivo en *Chrysolaena flexuosa*. a: botón floral; b: floración; c: fructificación plena.

2.3.5. Evaluación de caracteres morfológicos de interés ornamental

En plantas individuales de las siete introducciones se registraron a campo siete caracteres morfológicos cuantitativos de interés ornamental, en los ciclos de crecimiento 1 y 2 (Tabla 2.2 y Figura 2.4). A excepción del número de varas florales emitidas, los registros y mediciones se realizaron en el período de plena floración, es decir, cuando las flores del capítulo central estaban abiertas (antesis), sobre la primera vara floral emitida de cada planta (vara floral principal). La relación entre la longitud y el ancho de la hoja más larga (RLAF) se calculó como el cociente entre la longitud y el ancho de la hoja más larga presente en cada planta.

Tabla 2.2. Caracteres morfológicos cuantitativos empleados para la evaluación de las siete introducciones de *Chrysolea flexuosa* de la Argentina en dos ciclos de crecimiento.

Carácter morfológico	Abreviatura
Número de hojas	NHF
Número de varas florales emitidas	NV
Número de capítulos por vara floral	NC
Número de ramas o circinos	NR
Altura de la vara floral principal (cm)	AV
Relación entre la longitud y el ancho de la hoja más larga	RLAF
Diámetro del capítulo central (cm)	DC

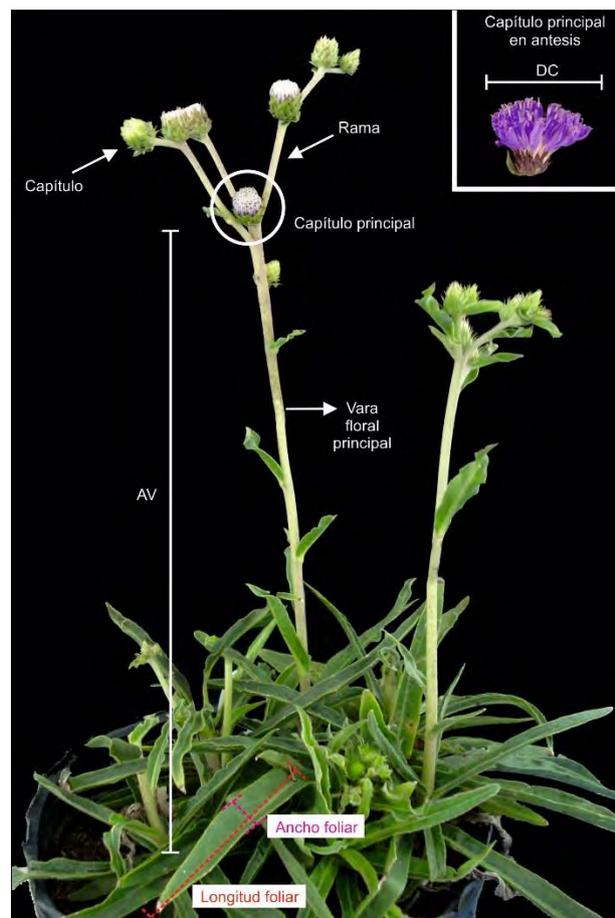


Figura 2.4. Ejemplar adulto de *Chrysolea flexuosa* en pre-antesis con indicación de algunos caracteres morfológicos cuantitativos registrados en siete introducciones silvestres de la Argentina en dos ciclos de crecimiento.

Ref.: AV: altura de la vara floral principal; DC: diámetro del capítulo principal en antesis.

2.3.6. Tamaño del xilopodio

Se estimó la evolución del tamaño del xilopodio en los dos ciclos de crecimiento. Para ello, los xilopodios de cada planta fueron fotografiados tres veces desde la brotación hasta la fructificación realizándose comparaciones visuales entre dichas fotografías.

2.3.7. Daños por plagas y/o patógenos

En ambos ciclos de crecimiento se registró la presencia de síntomas y/o signos de alguna enfermedad o daños por plagas causadas por vertebrados y/o invertebrados en el ensayo al aire libre. Las determinaciones de las especies detectadas se realizó en el Laboratorio de Patología Vegetal de la Unidad Integrada Balcarce.

2.3.8. Análisis de datos

2.3.8.1. Análisis de tipo univariado

Se realizaron análisis de tipo univariado, a partir de los datos registrados para cada una de las variables de la Tabla 2.2 en las siete introducciones de *Chrysolea flexuosa* evaluadas en los ciclos de crecimiento 1 y 2, mediante el uso de modelos lineales generalizados y mixtos (Pinheiro *et al.*, 2009). Los efectos de ciclo de crecimiento y bloque fueron considerados como fijos. Debido a que las introducciones en evaluación se consideraron como una muestra aleatoria de las poblaciones (Piepho y Möhring, 2006), la variación debida a las introducciones y la interacción introducción × ciclo de crecimiento fueron consideradas como de efectos aleatorios.

Modelo lineal mixto con observaciones a nivel de planta:

$$Y_{ijkl} = \mu + \beta_i + \tau_j + \gamma_k + (\tau\gamma)_{jk} + \varepsilon_{l(kij)}$$

Y_{ijkl} : observación de la l -ésima planta de la j -ésima introducción en el i -ésimo bloque y k -ésimo ciclo de crecimiento

μ : media general

β_i : efecto fijo del i -ésimo bloque

τ_j : efecto aleatorio de la j -ésima introducción

γ_k : efecto fijo del k -ésimo ciclo de crecimiento

$(\tau\gamma)_{jk}$: efecto aleatorio de la interacción entre la j-ésima introducción y el k-ésimo ciclo de crecimiento

$\varepsilon_{l(kij)}$: error aleatorio a nivel de planta

Todos los términos aleatorios fueron considerados independientes entre sí, con distribución normal de medias ceros y varianzas de magnitud a estimar. Las covarianzas entre los efectos aleatorios de introducción y de interacción introducción \times ciclo de crecimiento fueron consideradas nulas. La varianza de los τ_j es la varianza de las introducciones y la de los $\varepsilon_{l(kij)}$ contiene las fuentes de variación no controladas y la variación entre plantas de una misma parcela.

A partir de la prueba del cociente de máxima verosimilitud se determinó el nivel de significancia de la componente de interacción introducción \times ciclo de crecimiento para cada variable comparando un modelo que incluía el término de interacción contra otro que no lo incluía, (Pinheiro *et al.*, 2009).

Los términos del modelo con efectos fijos se analizaron mediante un ANOVA. Por su parte, para los términos con efectos aleatorios se estimaron las varianzas.

Dado que el uso de modelos lineales generales y mixtos consiste en la estimación de una combinación lineal de efectos fijos y aleatorios para los términos especificados en el modelo, se obtiene una valoración ajustada de los efectos fijos y de los componentes de la varianza asociados a los efectos aleatorios. Por lo tanto, se obtuvo al mejor predictor lineal insesgado o BLUP (Best Linear Unbiased Estimator) de los efectos aleatorios para cada introducción. Estos representaron el valor predicho de determinada variable de interés con respecto a la media general. Para cada BLUP se estimó el estadístico z al que se lo asoció un valor p que se empleó para determinar la superioridad o inferioridad de una introducción respecto a la media general. Un valor $p < 0,10$ se interpretó como indicador de desempeño significativamente diferente al promedio por parte de una introducción. Teniendo en cuenta el signo del BLUP, las introducciones se clasificaron como de comportamiento superior (signo positivo) o inferior (signo negativo) respecto al comportamiento medio general de acuerdo con Casanoves y Balzarini (2002).

Los análisis y los gráficos se realizaron en el ambiente computacional R v. 2.10.1, empleando los paquetes *nlme* (Pinheiro *et al.*, 2009) y *Lattice* (Sarkar, 2008).

3.2.8.2. Análisis multivariado de ordenación

Empleando los datos de los caracteres cuantitativos que figuran en la tabla 2.2 para los dos primeros ciclos de crecimiento de las plantas, se confeccionó una matriz con los valores de aquellos individuos que florecieron en ambos ciclos. Con este conjunto de datos se realizó un análisis de ordenamiento por medio de componentes principales (ACP) para el cual se calculó una matriz de correlación. Posteriormente se obtuvieron los autovalores y se efectuó la proyección en los dos primeros componentes.

Los análisis y los gráficos se realizaron en el ambiente computacional R v. 2.10.1, empleando los paquetes *FactoMineR* y *corrplot*.

2.4. Resultados

2.4.1. Caracterización de las condiciones ambientales de cada ciclo de crecimiento

En la Figura 2.5 se observa la curva de fotoperíodo típica para la localidad de Balcarce. En los meses de junio y julio (invierno), el fotoperíodo presenta un valor promedio de 10,5 hs de luz, mientras que en diciembre y enero (verano), el valor promedio del fotoperíodo es de 15,5 hs de luz.

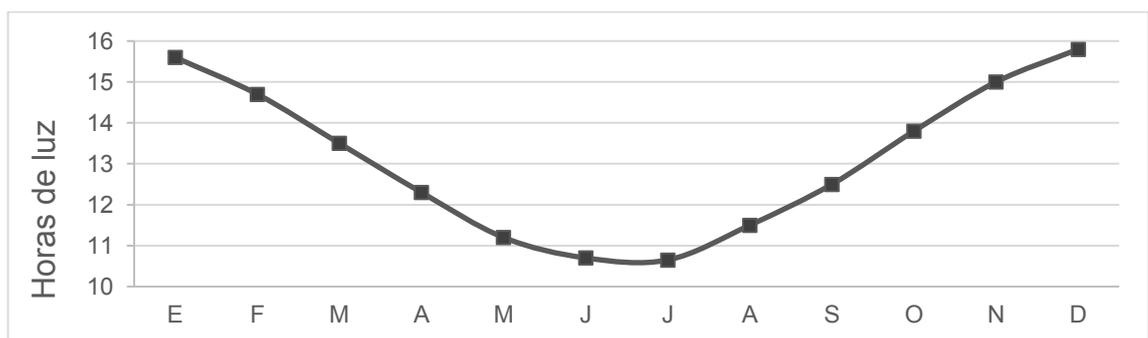


Figura 2.5. Evolución del fotoperíodo a lo largo del año para la localidad de Balcarce, provincia de Buenos Aires.

Nota: elaborado en base al "Programa para el cálculo de parámetros astronómicos" de la cátedra de Climatología y Fenología Agrícola de la Facultad de Agronomía de la UBA (FAUBA, 2017).

Las diferencias de temperatura media mensual entre ambos ciclos de crecimiento y el promedio histórico para la serie 2005-2014 no fueron importantes, exceptuando los

registros de marzo y abril de 2013 y de agosto de 2014, que difirieron de las temperaturas medias del promedio histórico en 2,4°, 2,2° y 2,3° C, respectivamente. Por otra parte, las mayores diferencias de temperatura media mensual entre los dos ciclos de crecimiento se registraron en los meses de enero, febrero, marzo, abril, agosto, septiembre y diciembre, con diferencias de entre 1,2° y 2,6° C (Figura 2.6).

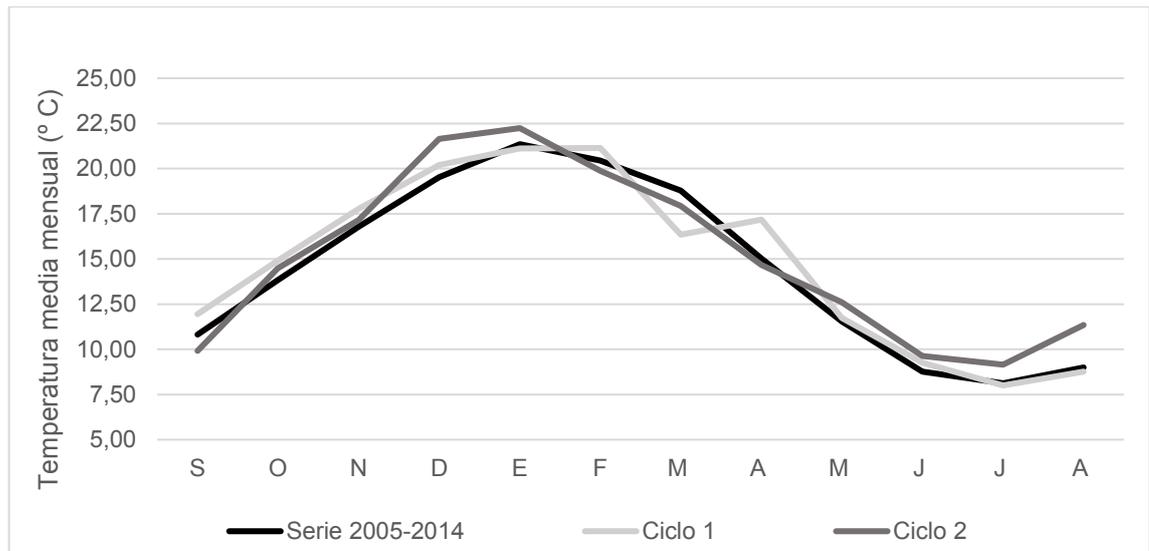


Figura 2.6. Temperatura media mensual (° C) para el promedio histórico de la serie 2005/2014 y para los ciclos de crecimiento 1 (2012/13) y 2 (2013/14) en la UIB, provincia de Buenos Aires.

Nota: elaborado en base a los registros suministrados por el Servicio de Agrometeorología de la EEA del INTA de Balcarce, provincia de Buenos Aires.

La precipitación anual acumulada en la UIB calculada para la serie 2005-2014 fue de 833,01 mm (Figura 2.7) y tanto en el ciclo 1 como en el ciclo 2 los registros fueron mayores, con 886,9 mm y 1151,7 mm acumulados, respectivamente. Para los meses de diciembre y enero, período de activa floración, la precipitación acumulada del ciclo 1 fue notablemente mayor que la registrada para el ciclo 2 y para la serie ya que para dichos meses se calculó una acumulación de 393,3 mm en el ciclo 1 contra 137,5 mm y 160 mm para los mismo meses en el ciclo 2 y en la serie, respectivamente. Otra diferencia notable se observó en el ciclo 2 para los meses de mayo, fin de fructificación, agosto, período de latencia, y septiembre y octubre, previo a floración, donde la precipitación acumulada superó en más del 50% los registros del ciclo 1 y de la serie para dichos meses.

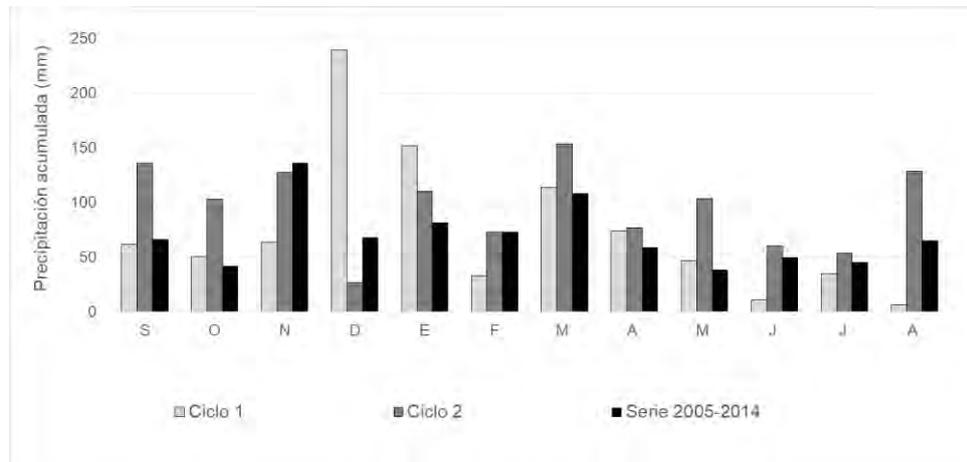


Figura 2.7. Precipitación mensual acumulada (mm) para el promedio histórico de la serie 2005/2014 y para los ciclos de crecimiento 1 (2012/13) y 2 (2013/14) en la UIB, provincia de Buenos Aires.

Nota: elaborado en base a los registros suministrados por el Servicio de Agrometeorología de la EEA del INTA de Balcarce, provincia de Buenos Aires.

Durante los meses de septiembre a diciembre la evapotranspiración potencial (ETP) media de los ciclos de crecimiento bajo estudio, y en particular los del ciclo 1, superó a la de la serie 2005/14 (Figura 2.8). La ETP media del mes de enero, del ciclo de crecimiento 2, superó tanto a los registros de la serie 2005/14 como a los del ciclo 1, mientras que en febrero del ciclo 2 ocurrió lo opuesto. De marzo en adelante no se registraron diferencias notables en la ETP media entre ambos ciclos de crecimiento.

Las condiciones climáticas registradas permitirían considerar que los ambientes evaluados fueron distintos. El ambiente representado por el segundo ciclo de crecimiento resultó más húmedo ya que en los meses de septiembre a noviembre y de marzo a agosto del ciclo 2 se registraron mayores valores medios de precipitación y menores de ETP.

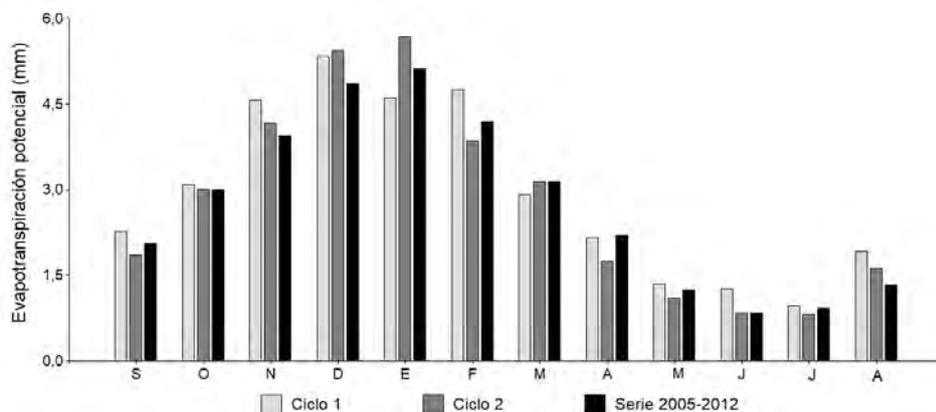


Figura 2.8. Evapotranspiración potencial media mensual (mm) para el promedio histórico de la serie 2005/2014 y para los ciclos de crecimiento 1 (2012/13) y 2 (2013/14) en la UIB, provincia de Buenos Aires.

Nota: elaborado en base a los registros suministrados por el Servicio de Agrometeorología de la EEA del INTA de Balcarce, provincia de Buenos Aires.

2.4.2. Fenología

El número de individuos que sobrevivieron al cultivo al aire libre (=plantas establecidas) varió entre introducciones. De la introducción VdPDFV 26 sobrevivieron 16 plantas, de VdPDFV 14, 20 plantas, de Nu 1, 22 plantas y de las restantes introducciones, las 24 plantas iniciales.

El porcentaje de plantas establecidas que alcanzó la etapa reproductiva varió entre ciclos de crecimiento y entre introducciones (Figura 2.9). En ambos ciclos, las introducciones VdPDFV 26 y VdPDFV 45 registraron los mayores porcentajes de plantas que alcanzaron dicha etapa. En el ciclo 2 todas las introducciones registraron un aumento en el porcentaje de plantas que alcanzaron la etapa reproductiva (entre 45,5 y 75,0 % para el ciclo 1 versus entre 54,2 y 91,7 para el ciclo 2). Sin embargo, el incremento en dicho porcentaje de un ciclo a otro no fue similar entre las introducciones, evidenciando la presencia de interacción entre introducciones y ciclo de crecimiento para la variable considerada.

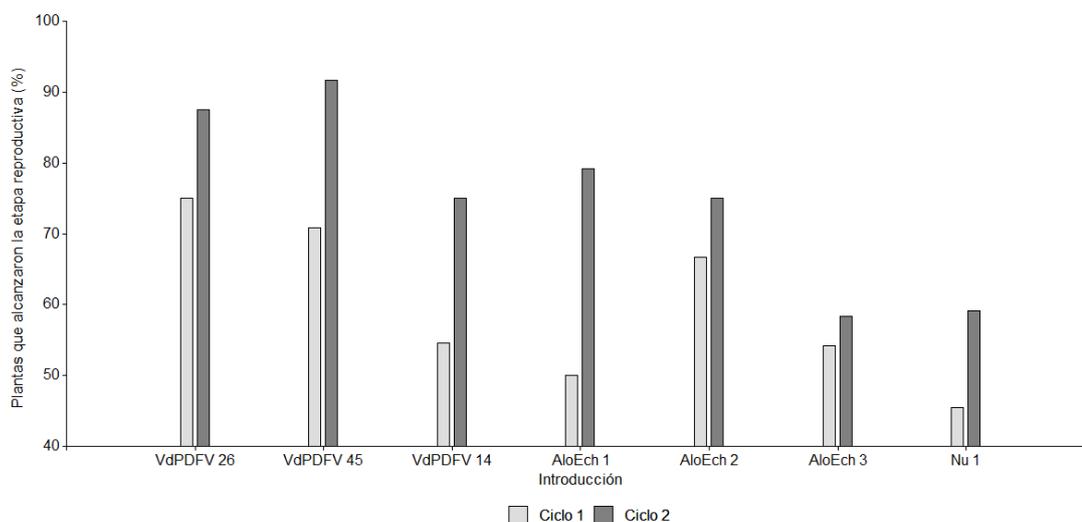


Figura 2.9. Porcentaje de plantas de siete introducciones de *Chrysoaena flexuosa* que alcanzaron la etapa reproductiva en los ciclos de cultivo 1 (2012/2013) y 2 (2013/2014) en la UIB, provincia de Buenos Aires.

En relación a la etapa reproductiva, en la Figura 2.10 se aprecia de forma esquemática el inicio de cada uno de los sub-estados de la misma para cada una de las introducciones de *Chrysoaena flexuosa* en los ciclos de cultivo 1 y 2. Los extremos anterior y posterior de cada línea señalan el momento en que se inició cada sub-estado de la etapa reproductiva en la primera y la última planta, respectivamente. Independientemente de la introducción considerada se observó que la etapa reproductiva se inició más precozmente en el ciclo 2 que en el ciclo 1. Los botones florales se registraron entre principios y mediados de enero de 2013 en el ciclo 1 y a fines de octubre-principios de noviembre de 2013 en el ciclo 2. Las últimas plantas en fructificar se registraron entre abril y mayo del 2013 para el ciclo 1 y entre febrero y marzo de 2014 para el ciclo 2. Las introducciones bajo análisis no mostraron un patrón definido en cuanto al inicio o finalización de la etapa reproductiva. Durante el ciclo 1, las primeras plantas en exhibir botones florales pertenecieron a la introducción VdPDFV 26 y las últimas a VdPDFV 14 y AloEch 1, mientras que en el ciclo 2 las primeras pertenecieron a AloEch 1 y las últimas a VdPDFV 45. Con respecto a la fructificación, las primeras plantas en exhibir papus durante el ciclo 1 pertenecieron a la introducción AloEch 2 y las últimas a VdPDFV 45, mientras que en el ciclo 2 las primeras pertenecieron a Nu 1 y las últimas a VdPDFV 45.

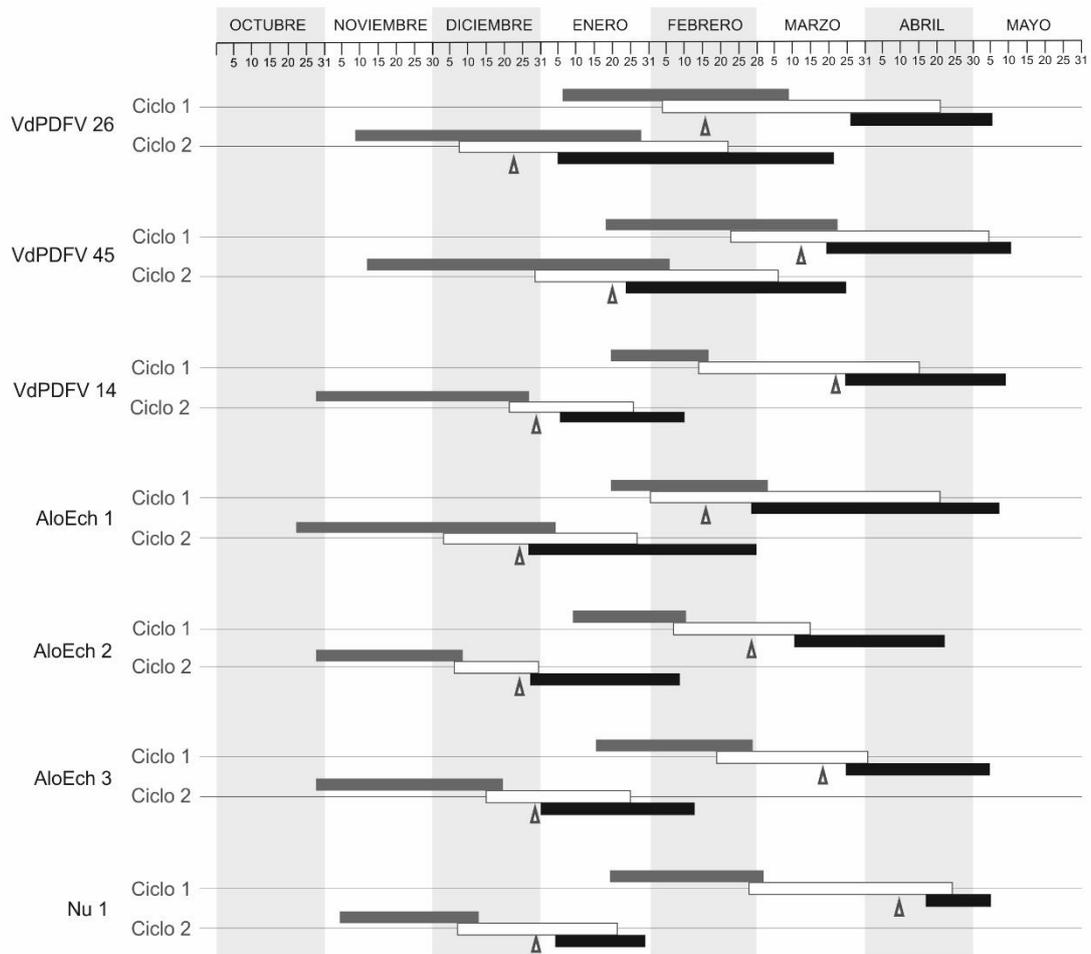


Figura 2.10. Representación esquemática del inicio de la etapa reproductiva de siete introducciones de *Chrysolaena flexuosa* en Balcarce, provincia de Buenos Aires, en los ciclos de crecimiento 1 (2012/2013) y 2 (2013/2014).

Nota: los extremos anterior y posterior de cada línea señalan el momento de inicio de cada sub-estado de la etapa reproductiva en la primera y la última planta, respectivamente. Línea gris= botón floral; línea blanca: floración; línea negra= fructificación; triángulo= período de máxima floración.

En la Figura 2.10 se observan, además, triángulos que señalan el momento de máxima floración, es decir aquel en el que se registró mayor número de plantas de una misma introducción en antesis. El momento de máxima floración varió en función del ciclo del crecimiento y la introducción considerada. En el ciclo 1 se registró a mediados de febrero de 2013 para las introducciones VdPDFV 26 y AloEch 1; a fines de dicho mes para AloEch 2; a mediados y a fines de marzo de 2013 para VdPDFV 45, AloEch 3 y VdPDFV 14, respectivamente; y a principios de abril de 2013 para Nu 1. Por el contrario,

en el ciclo 2 se observó sincronía del período de máxima floración a fines de diciembre del 2013 para la mayoría de las introducciones, con excepción de VdPDFV 45 que registró el momento de máxima floración un mes más tarde.

La duración de la etapa reproductiva fue de entre 35 y 151 días, variando en función del genotipo y del ciclo de crecimiento. En general, la duración de la etapa reproductiva fue menor en el ciclo 2, con un promedio de 66,8 días (D.E.=±13,3 días) *versus* 72,6 días (D.E.= ±15,0 días) para el ciclo 1. Cabe destacar que en cada introducción se registraron individuos cuya duración de la etapa reproductiva se alejó de los valores promedios y que dicha dispersión fue en general más grande en el ciclo 1 (Figura 2.11). Independientemente del ciclo considerado, VdPDFV 45 presentó mayores valores de duración de la etapa reproductiva.

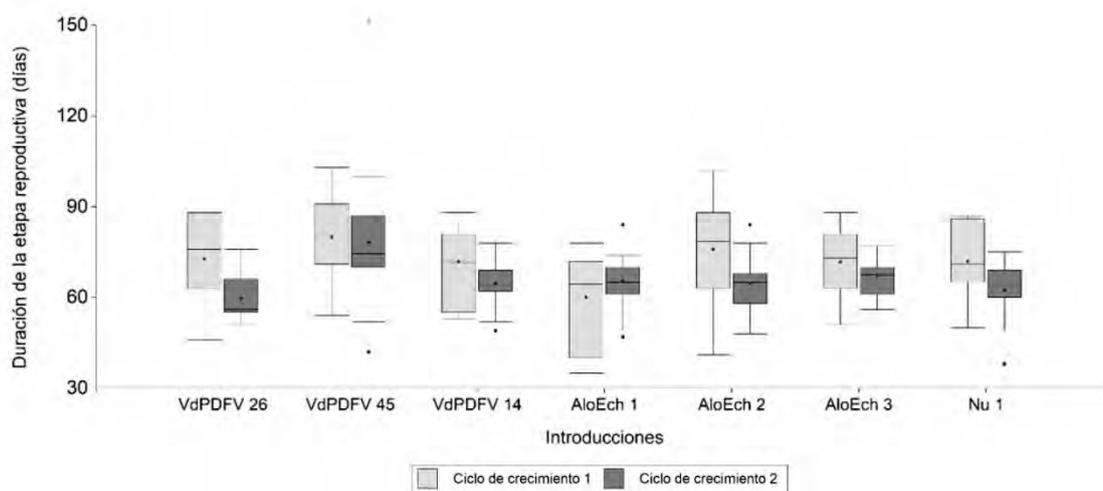


Figura 2.11. Duración en días de la etapa reproductiva de siete introducciones de *Chrysolaela flexuosa* en Balcarce, provincia de Buenos Aires, en los ciclos de crecimiento 1 (2012/2013) y 2 (2013/2014).

Ref.: caja= 50% de los datos centrales; línea dentro de caja= mediana; punto dentro de caja= media; puntos fuera de la caja= valores extremos.

2.4.3. Análisis de caracteres morfológicos cuantitativos en dos ciclo de crecimiento

2.4.3.1. Número de hojas

Durante el ciclo 1, las introducciones registraron un promedio de 22,5 hojas, con un rango para esta variable de 7 a 56 hojas, mientras que durante el ciclo 2, la media

obtenida fue de 60,9 hojas, y el rango de 9 a 120 hojas. Las introducciones VdPDFV 26 y VdPDFV 45 presentaron en ambos ciclos de crecimiento el mayor número de hojas promedio y el mayor número de hojas a nivel de planta individual mientras que Nu 1 el menor.

La prueba del cociente de máxima verosimilitud marcó un nivel de significancia de $p=0,0055$ para el componente de la interacción introducción \times ciclo de crecimiento. En la Figura 2.12a se refleja la interacción detectada entre introducciones y ciclo de crecimiento ya que, a pesar de que en el segundo ciclo de cultivo las plantas presentaron mayor número de hojas, las diferencias en esta variable entre introducciones de un ciclo de cultivo a otro no fueron iguales. También pueden observarse allí, ciertos cambios en el orden relativo de mérito de las introducciones al comparar el ciclo 1 de evaluación con el ciclo 2.

El ANOVA de los efectos fijos arrojó un p -valor= $0,0001$ para la fuente de variación ciclo de crecimiento, por lo que las medias de NHF para cada ciclo fueron significativamente diferentes entre sí. En el ciclo 2 casi se triplicó el promedio de NHF con respecto ciclo 1 (Figura 2.12a).

Con respecto al análisis de los efectos aleatorios, se registró que la fuente de variación más importante fue debida a diferencias entre plantas de una misma introducción para un mismo ciclo de crecimiento (64,7%). Esto se refleja en la Figura 2.10a donde la gran variabilidad intrapoblacional para NHF queda explicitada a partir de las notables distancias entre máximos y mínimos de cada diagrama de caja y, en ocasiones, a la presencia de valores atípicos. Con respecto a la variación total detectada, la debida a las diferencias entre introducciones quedó en segundo lugar (24,1%) y por último, quedó la interacción debida a la interacción introducción \times ciclo de crecimiento.

En la Tabla 2.3 se presentan los BLUPs del efecto aleatorio de cada introducción. Los valores de BLUP variaron entre -9,42 y 13,12, indicando desviación de consideración en el NHF por introducción respecto a la media general. En ambos ciclos de crecimiento los mayores números de hojas promedio correspondieron a las introducciones VdPDFV 26 y VdPDFV 45, y el menor a Nu 1. Sin embargo, solo VdPDFV 45 mostró un comportamiento estadísticamente diferente a la media ($p=0,07$), con un promedio de NHF de 30,8 y 84,6 hojas, para los ciclos de crecimiento 1 y 2, respectivamente.

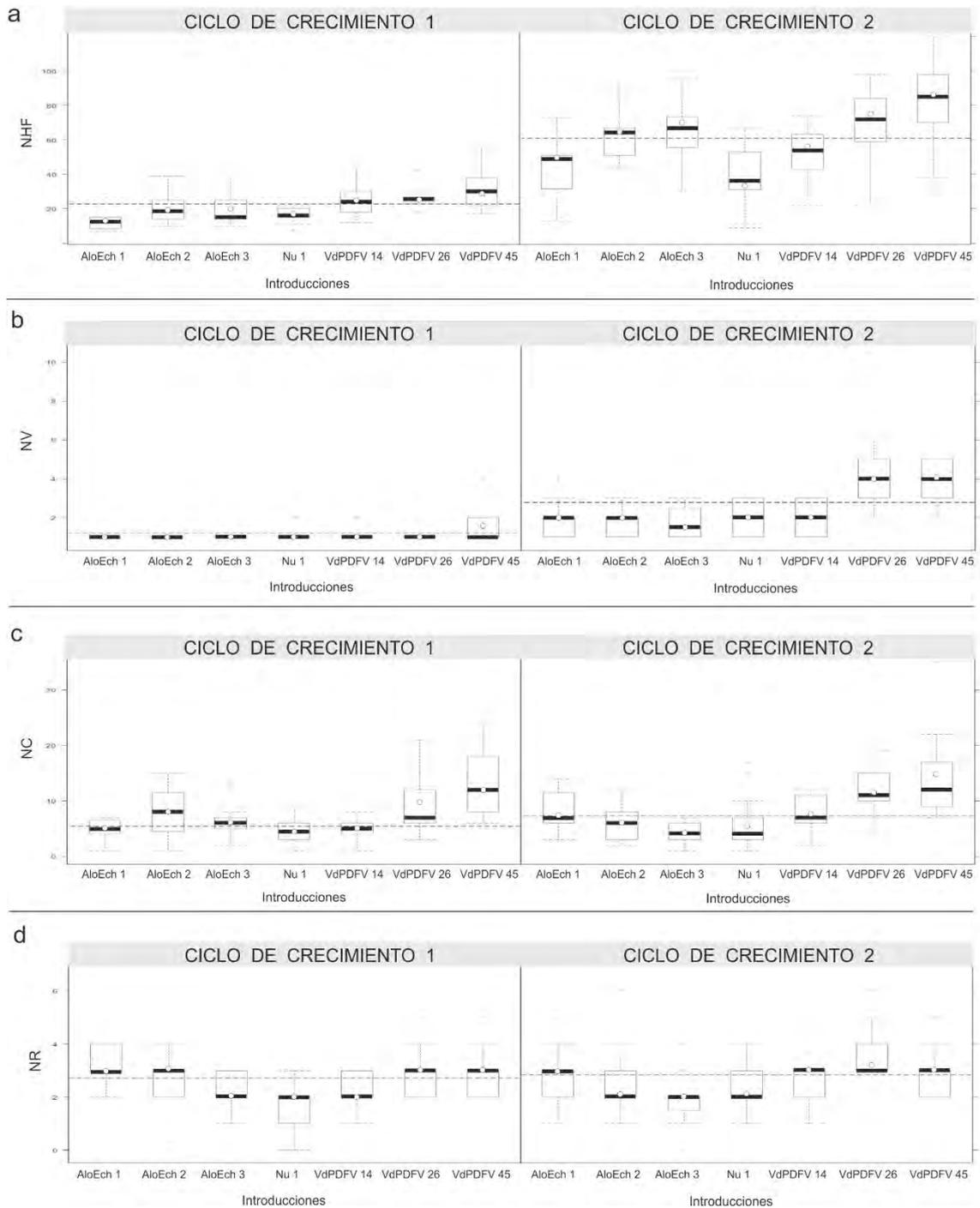


Figura 2.12. Diagramas de caja para cuatro variables cuantitativas registradas en dos ciclos de cultivo en siete introducciones de *Chrysolea flexuosa*.

Ref.: caja= 50% de los datos centrales; línea dentro de caja= mediana; punto dentro de caja= media; puntos fuera de la caja= valores atípicos.; línea punteada que atraviesa cada ciclo de crecimiento= promedio general. Abreviaturas: NHF, número de hojas; NV, número de varas florales; NC, número de capítulos NR, número de ramas por vara floral principal.

Tabla 2.3. Estimadores de efectos aleatorios referidos como BLUP en relación a la media general y la probabilidad asociada a cada valor de z (p-valor) para siete caracteres de valor ornamental en siete introducciones de *Ch. flexuosa*.

Carácter	Introducciones						
	VdPDFV 26	VdPDFV 45	VdPDFV 14	AloEch 1	AloEch 2	AloEch 3	Nu 1
NHF	6,54	13,12	-2,85	-9,01	0,75	0,86	-9,42
	p=0,24	p=0,07*	p=0,18	p=0,16	p=0,47	p=0,46	p=0,15
NV	0,29	0,36	-0,12	-0,13	-0,15	-0,13	-0,09
	p=0,21	p=0,15	p=0,21	p=0,53	p=0,33	p=0,35	p=0,40
NR	0,45	0,23	-0,18	0,02	-0,02	-0,42	-0,32
	p=0,11	p=0,26	p=0,31	p=0,47	p=0,47	p=0,12	p=0,19
NC	2,32	5,56	-1,37	-0,96	-0,81	-2,44	-2,29
	p=0,22	p=0,03*	p=0,35	p=0,37	p=0,39	p=0,21	p=0,22
AV	0,29	2,41	0,29	1,48	0,12	-3,32	-2,35
	p=0,45	p=0,16	p=0,45	p=0,27	p=0,48	p=0,085*	p=0,16
RLAF	3,15	5,68	-2,68	-1,52	-1,58	-2,11	-0,92
	p=0,16	p=0,03*	p=0,20	p=0,31	p=0,31	p=0,25	p=0,38
DC	-0,58	-0,30	0,04	0,10	0,18	0,28	0,26
	p=0,04*	p=0,18	p=0,45	p=0,38	p=0,29	p=0,20	p=0,21

2.4.3.2. Número de varas florales

En la mayoría de las plantas se registró, durante el ciclo 1, una vara floral, aunque en algunos individuos de Nu1, VdPDFV 14 y VdPDFV 26 se registraron dos y, en algunos de VdPDFV 45, hasta cuatro. En el ciclo 2, el promedio de NV fue de 2,6 varas y el rango de NV estuvo comprendido entre 1 a 11 varas, dependiendo de la introducción considerada, siendo las introducciones VdPDFV 26 y VdPDFV 45 quienes se caracterizaron por presentar los mayores valores promedio de NV (Figura 2.12b).

La prueba del cociente de máxima verosimilitud realizada para la variable NV marcó un nivel de significancia de $p=0,0001$ para el componente de la interacción introducción x ciclo de crecimiento. Dicha interacción se puede observar en la Figura 2.12b ya que, a pesar de que en el segundo ciclo de cultivo las plantas presentaron mayor NV, las diferencias en esta variable entre introducciones de un ciclo de crecimiento a otro no fueron similares.

El ANOVA de los efectos fijos arrojó un $p\text{-valor}=0,0053$ para la fuente de variación ciclo de crecimiento, por lo que las medias de NV para cada ciclo fueron significativamente diferentes entre sí. Durante el ciclo 1 se registró, en general, una vara floral por planta mientras que en el ciclo 2 se registró un NV promedio por introducción

superior al doble del registrado en el primer año (Figura 2.12b). Las introducciones VdPDFV 45, VdPDFV 26, VdPDFV 14 y Nu 1 presentaron en ambos ciclos el mayor número de varas florales promedio, pero VdPDFV 45 y VdPDFV 26 se destacaron en el ciclo 2 por presentar plantas con 5 a 11 varas florales.

El análisis de los efectos aleatorios arrojó que la fuente de variación más importante fue debida a diferencias entre plantas de una misma introducción para un mismo ciclo de cultivo (65,2%), seguida por la debida a la interacción introducción \times ciclo de crecimiento (25,2%) y finalmente la debida a las diferencias entre introducciones (9,6%). Esto se refleja en la Figura 2.11b donde la gran variabilidad intrapoblacional para NV queda explicitada, principalmente en el ciclo 2, a partir de las notables distancias entre máximos y mínimos de cada diagrama de caja y en ocasiones, a la presencia de valores atípicos.

Para esta variable, los valores de BLUP variaron entre -0,15 y 0,36, indicando escasa desviación en el NV por introducción respecto a la media general (Tabla 2.3). A pesar de que las introducciones VdPDFV 45 y VdPDFV 26 presentaron en general mayor NV, para ninguna de las introducciones evaluadas se detectó un comportamiento estadísticamente diferente a la media ($\alpha=0,10$).

2.4.3.3. Número de capítulos por vara floral

En el ciclo de crecimiento 1, el NC promedio fue de 7,7, con plantas con uno a 24 capítulos por vara floral, mientras que en el segundo ciclo el promedio de NC fue de 8,8, con uno a 36 capítulos por vara. Las introducciones con menor número de capítulos provinieron de poblaciones originarias de las provincias de Entre Ríos y Buenos Aires, con un NC promedio de 5,7 y 6,6 para los ciclos de crecimiento 1 y 2, respectivamente. Por su parte, las introducciones de Corrientes y Misiones (VdPDFV 45 y VdPDFV 26), presentaron un promedio de NC de aproximadamente el doble del promedio de las anteriores, con valores de 11,1 y 13,1 para cada uno de los ciclos.

La prueba del cociente de máxima verosimilitud realizada para la variable NC marcó un nivel de significancia de $p=0,22$ para el componente de la interacción introducción \times ciclo de crecimiento. La ausencia de interacción significativa entre introducciones y ciclo de crecimiento se observa en la Figura 2.12c donde las diferencias para NC promedio entre introducciones de un ciclo de crecimiento a otro fueron similares.

El ANOVA de los efectos fijos arrojó un p-valor=0,07 para la fuente de variación ciclo de crecimiento por lo que, tomando un nivel de significancia del 5%, no se detectaron diferencias significativas en el NC entre ciclos de crecimiento.

El análisis de los efectos aleatorios arrojó que la principal fuente de variación fue debida a diferencias entre plantas de una misma introducción en un mismo ciclo de crecimiento (68,7%) y, en menor medida, a las diferencias entre las introducciones (31,3%). Esto se puede apreciar en la Figura 2.12c donde la variabilidad intrapoblacional para la variable NC se ve reflejada en las distancias entre máximos y mínimos de cada diagrama de caja y en la eventual presencia de valores atípicos en ambos ciclos de crecimiento.

Los valores de BLUP para NC variaron entre -2,29 y 5,56, indicando leve desviación en NC por introducción respecto a la media general (Tabla 2.3). A pesar de que las introducciones VdPDVF 26 y VdPDVF 45 registraron los mayores valores promedio de NC -10,7 y 13,9 capítulos respectivamente- solo VdPDVF 45 mostró un comportamiento estadísticamente diferente y significativamente superior a la media ($p=0,03$).

2.4.3.4. Número de ramas por vara floral

A pesar de que todas las introducciones estuvieron mayormente representadas por plantas que presentaron entre dos y tres ramas por vara floral, independientemente del ciclo de crecimiento, se registraron plantas con hasta siete ramas por vara floral

La prueba del cociente de máxima verosimilitud realizada para la variable NR marcó un nivel de significancia de $p=0,47$ para el componente de la interacción introducción \times ciclo de crecimiento. La ausencia de interacción significativa entre introducciones y ciclo de crecimiento se observa en la Figura 2.12d ya que de un ciclo de crecimiento a otro las introducciones no presentaron diferencias entre sí para el NR.

El ANOVA de los efectos fijos arrojó un p-valor=0,45 para la fuente de variación ciclo de crecimiento por lo que, tomando un nivel de significancia del 5%, no se detectaron diferencias significativas en el NR para cada ciclo de crecimiento. En este sentido, el NR promedio permaneció casi idéntico del ciclo 1 al 2 (2,6 y 2,7 ramas, respectivamente). Las introducciones VdPDVF 45 y VdPDVF 26 presentaron los mayores registros medios de NR mientras que AloEch 3 y Nu 1 los menores.

El análisis de los efectos aleatorios arrojó que la principal fuente de variación para el NR fue debida a diferencias entre plantas de una misma introducción y mismo ciclo de crecimiento (72,6%) y en menor medida a las diferencias entre las introducciones

(22,4%). Esto puede apreciarse en la Figura 2.12d donde la variabilidad intrapoblacional para la variable NR se ve reflejada en las distancias entre máximos y mínimos de cada diagrama de caja y en la eventual presencia de valores atípicos en ambos ciclos de crecimiento.

Los valores de BLUP para NR variaron entre -0,42 y 0,45, indicando leve desviación en el NR por introducción respecto a la media general (Tabla 2.3). A pesar de que las introducciones VdPDVF 45 y VdPDVF 26 presentaron en promedio valores de NR más altos que las otras introducciones (3,2 y 2,9 ramas, respectivamente) y AloEch 3 y Nu 1 más bajos (2,1 y 2,3 ramas, respectivamente), ninguna de las introducciones evaluadas mostró un comportamiento estadísticamente diferente a la media.

2.4.3.5. Altura de la vara floral

La AV media general fue de 19,9 cm y 24,1 cm para los ciclos de crecimiento 1 y 2, respectivamente. En el ciclo 1, la AV mínima registrada fue de 5,4 cm y la máxima de 35,0 cm. En el ciclo 2, en cambio, el rango de AV estuvo comprendido entre los 6 y los 55 cm. En ambos ciclos de crecimiento, AloEch 3 y Nu 1 se caracterizaron por tener los menores registros de AV (media general= 17,3 y 18,7 cm, respectivamente) mientras que AloEch 1, VdPDVF 26 y VdPDVF 45 los mayores (media general= 24,2; 23,7 y 25,1 cm, respectivamente).

La prueba del cociente de máxima verosimilitud marcó un nivel de significancia de $p=0,016$ para el componente de la interacción introducción \times ciclo de crecimiento. La detección de interacción significativa entre introducciones y ciclo de crecimiento se puede observar en la Figura 2.13a. En el segundo ciclo de crecimiento la mayoría de las introducciones presentaron un incremento en la altura promedio de las varas florales. A pesar de que dicho incremento fue leve, las diferencias en esta variable, entre introducciones de un ciclo de cultivo a otro, no fueron similares.

El ANOVA de los efectos fijos arrojó un p -valor=0,0001 para la fuente de variación ciclo de crecimiento por lo que las medias de AV para cada ciclo fueron significativamente diferentes entre sí. En el ciclo 2 los valores medios de AV fueron superiores a los del ciclo 1.

El análisis de los efectos aleatorios arrojó que la fuente de variación principal fue debida a diferencias entre plantas de una misma introducción y un mismo ciclo de crecimiento (90,3%), y muy en menor medida a las diferencias entre las introducciones (9,9%). Esto puede apreciarse en la Figura 2.13a donde la gran variabilidad

intrapoblacional para la variable AV se ve reflejada en las considerables distancias entre máximos y mínimos de cada diagrama de caja y en la presencia de valores atípicos en ambos ciclos de crecimiento.

Los valores de BLUP para AV variaron entre -3,32 y 2,41, indicando leve desviación en la AV por introducción respecto a la media general (Tabla 2.3). De las introducciones evaluadas solo AloEch 3 mostró un comportamiento estadísticamente diferente y significativamente inferior a la media ($p=0,085$), con una media de AV de 17,6 cm y 16,9 cm, para los ciclos de crecimiento 1 y 2, respectivamente.

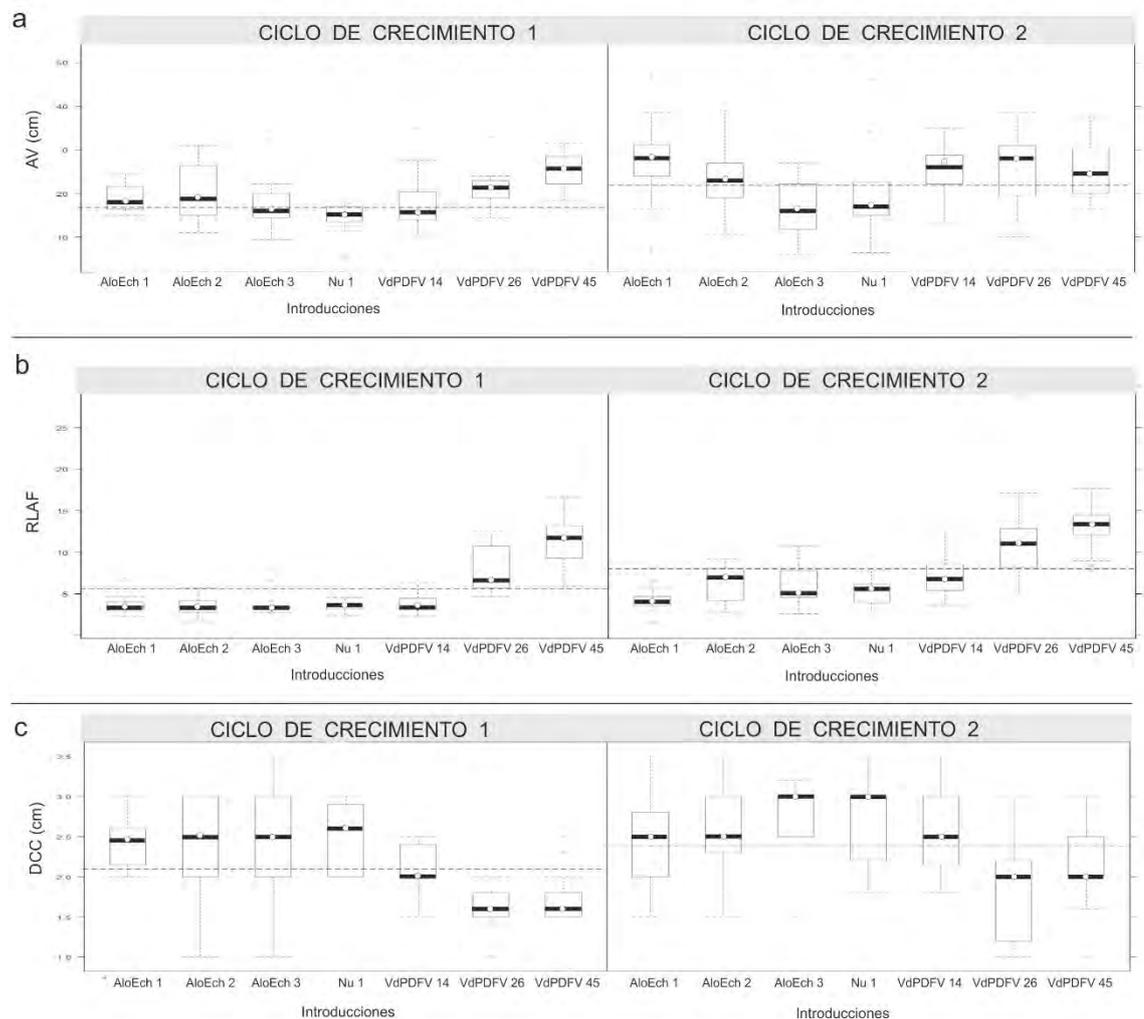


Figura 2.13. Diagramas de caja para cuatro variables cuantitativas registradas en dos ciclos de cultivo en siete introducciones de *Chrysolaena flexuosa*.

Ref.: caja= 50% de los datos centrales; línea dentro de caja= mediana; punto dentro de caja= media; puntos fuera de la caja= valores atípicos.; línea punteada que atraviesa cada ciclo de crecimiento= promedio general. Abreviaturas: AV: altura de la vara floral principal; RLAF: relación entre el largo y el ancho de la hoja más larga en floración; DCC, diámetro del capítulo central.

2.4.3.6. Relación entre la longitud y el ancho de la hoja más larga

En el ciclo 1, la RLAF promedio general fue de 5,6, con valores extremos por planta de entre 1,9 a 16,7, mientras que en el ciclo 2 el promedio general fue de 7,9, con un rango por planta de entre 1,5 a 28,6. Las introducciones con menor RLAF promedio fueron, independientemente del ciclo de crecimiento considerado, AloEch 1, AloEch2, AloEch 3, Nu 1 y VdPDFV 14. Por su parte, las introducciones VdPDFV 45 y VdPDFV 26 presentaron un promedio de RLAF de al menos el doble al promedio de las otras introducciones evaluadas.

La prueba del cociente de máxima verosimilitud realizada para esta variable marcó un nivel de significancia de $p=0,822$ para la componente de la interacción introducción \times ciclo de crecimiento. La ausencia de interacción significativa entre introducciones y ciclo de crecimiento se observa en la Figura 2.13b ya que no se evidencia entre las introducciones diferencias entre sí en esta variable, de un ciclo de crecimiento a otro.

El ANOVA de los efectos fijos arrojó un p -valor=0,0001 para la fuente de variación ciclo de crecimiento, detectándose así diferencias significativas en la RLAF para cada ciclo de crecimiento. En el ciclo 2 se registraron valores de RLAF significativamente superiores a los del ciclo 1 (Figura 2.13b y 2.14). Mientras que la media general para la longitud foliar de la hoja más larga se mantuvo casi constante del ciclo de crecimiento 1 al 2 (10,3 cm y 10,1 cm, respectivamente), en todas las introducciones se registraron, en promedio, hojas más angostas para el ciclo 2 (Figura 2.15), siendo la media general del ancho foliar de 2,2 cm para el ciclo de crecimiento 1 y de 1,6 cm para el ciclo 2. Esto explicaría el incremento en la RLAF registrada en el segundo ciclo.

El análisis de los efectos aleatorios arrojó que la principal fuente de variación para la RLAF fue debida a las diferencias entre las introducciones (60,6%), y en menor medida a diferencias entre plantas de una misma introducción y mismo ciclo de cultivo (39,4%).

Los valores de BLUP para RLAF variaron entre -2,68 y 5,68, indicando desviación en la RLAF por introducción respecto a la media general (Tabla 2.3). A pesar de que las introducciones VdPDFV 45 y VdPDFV 26 presentaron en promedio valores para esta variable superiores a los de las otras introducciones, sólo en la introducción VdPDFV 45 se detectó un comportamiento estadísticamente diferente y superior a la media ($p=0,03$).

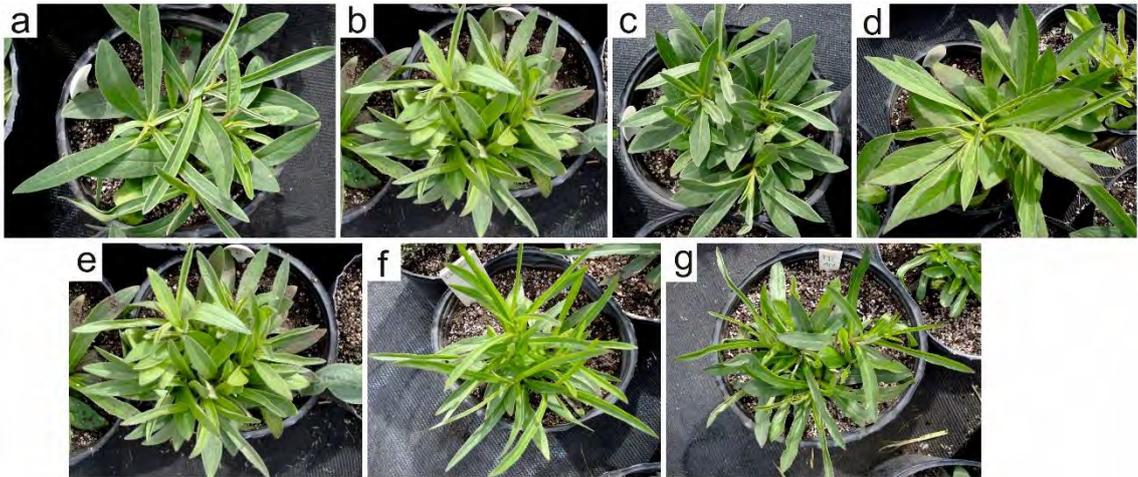


Figura 2.14. Ejemplares de *Chrysoleaena flexuosa* al final de la fructificación, procedentes de siete introducciones del centro este (a: AloEch 2; b: AloEch 3; c: Nu 1; d: AloEch 1) y del noreste argentino (e: VdPDFV 14; f: VdPDFV 45; g: VdPDFV 26) en su segundo ciclo de crecimiento en la UIB, partido de Balcarce, provincia de Buenos Aires.

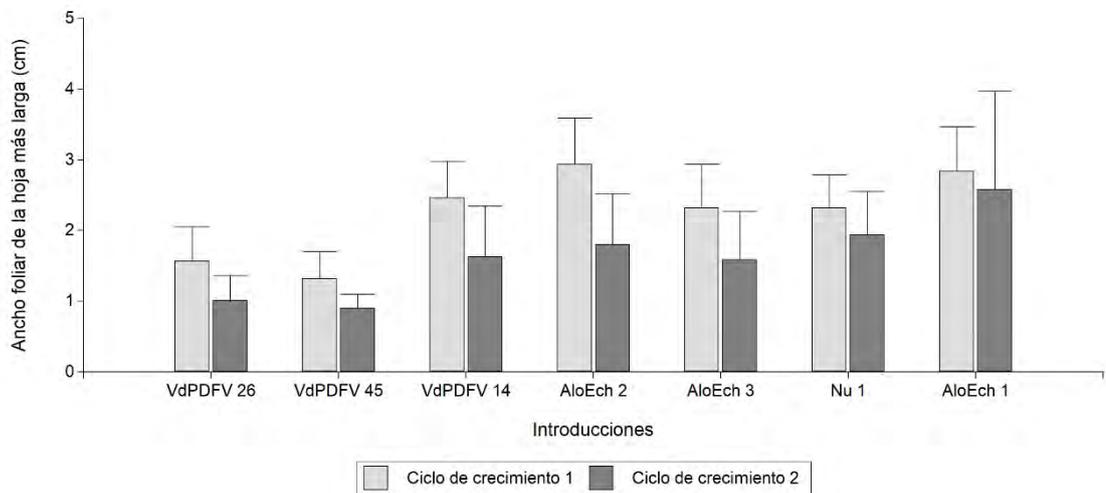


Figura 2.15. Ancho foliar medio de la hoja más larga (cm) de siete introducciones argentinas de *Chrysoleaena flexuosa* registrado en dos ciclos de cultivo en la UIB, partido de Balcarce, provincia de Buenos Aires.

Nota: las barras señalan desvío estándar.

2.4.3.7. Diámetro del capítulo central

Las plantas registraron variación en el DC ya que el rango para esta variable estuvo comprendido entre 1 cm y 3,5 cm. En general e independientemente del ciclo de crecimiento, la introducción procedente de la provincia de Entre Ríos presentó valores del DC próximos a la media general registrada, las procedentes de la Provincia de Buenos Aires superiores, y las de las provincias de Corrientes y Misiones, inferiores a la misma (Figura 2.13c y Figura 2.16).

La prueba del cociente de máxima verosimilitud realizada para esta variable marcó un nivel de significancia de $p=0,99$ para la componente de la interacción introducción \times ciclo de crecimiento. La ausencia de interacción significativa entre introducciones y ciclo de crecimiento se observa en la Figura 2.13c ya que no se evidencia entre las introducciones diferencias en el DC de un ciclo de crecimiento a otro.

El ANOVA de los efectos fijos arrojó un p -valor= $0,0002$ para la fuente de variación ciclo de crecimiento, detectándose así diferencias significativas en el DC entre ciclos. En el ciclo 2 se registraron valores medios para el DC significativamente superiores a los del ciclo 1 (2,4 cm *versus* 2,2 cm, respectivamente) (Figura 2.13c). Con excepción de Nu 1, las introducciones presentaron un aumento en la longitud de las corolas del ciclo de crecimiento 1 al 2 (Figura 2.17). Por lo tanto, el incremento en el DC del ciclo de crecimiento 1 al 2 estuvo relacionado con el incremento en la longitud de las corolas.

El análisis de los efectos aleatorios arrojó que la principal fuente de variación para el DC fue debida a diferencias entre plantas de una misma introducción y mismo ciclo de crecimiento (68,5%), y en menor medida a las diferencias entre las introducciones (31,5%). Esto se puede apreciar en la Figura 2.13c donde la variabilidad intrapoblacional para DCC se ve reflejada en la apertura de las cajas y en las distancias entre máximos y mínimos de cada diagrama de caja y en la eventual presencia de valores atípicos en ambos ciclos de crecimiento.

Los valores de BLUP para DCC variaron entre -0,58 y 0,28, indicando leve desviación en el DC por introducción respecto a la media general (Tabla 2.3). A pesar de que las introducciones VdPDFV 45 y VdPDFV 26 presentaron en promedio valores de DC inferiores a los de las otras introducciones, sólo la introducción VdPDFV 26 mostró un comportamiento estadísticamente diferente ($p=0,04$) e inferior a la media (Figura 2.16 y 2.17).

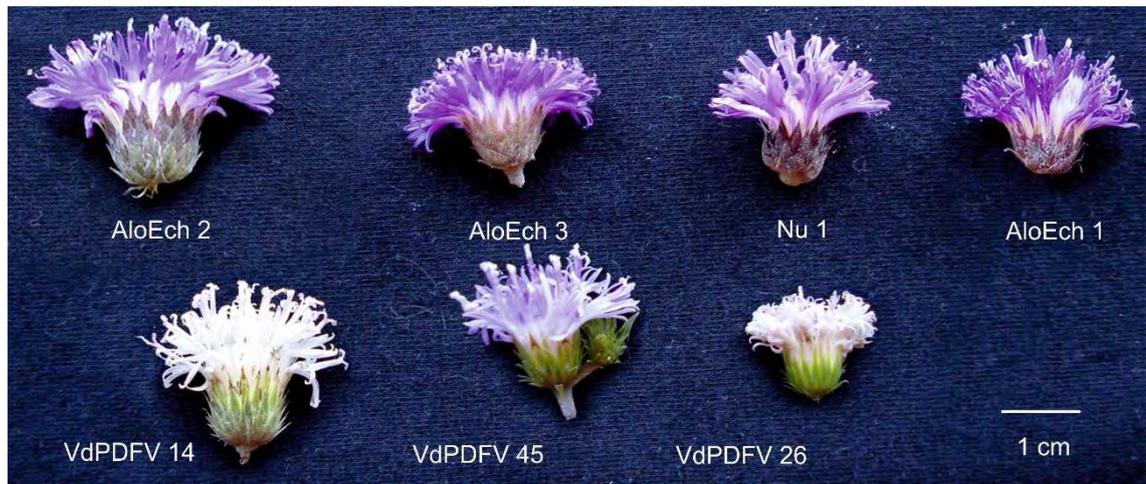


Figura 2.16. Capítulos de *Chrysoaena flexuosa* de siete introducciones de la Argentina cultivadas en la UIB, partido de Balcarce, provincia de Buenos Aires.

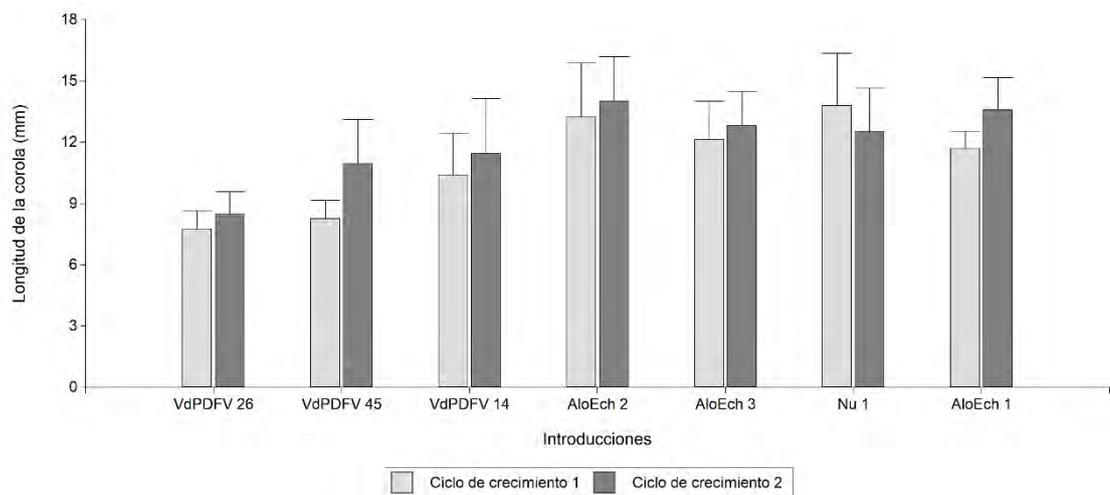


Figura 2.17. Longitud media de la corola (mm) de siete introducciones argentinas de *Chrysoaena flexuosa* registradas en dos ciclos de crecimiento en la UIB, partido de Balcarce, provincia de Buenos Aires.

Nota: las estimaciones se obtuvieron a partir del promedio de la longitud de tres corolas tomadas al azar por cada planta. Las barras señalan desvío estándar.

2.4.3.8. Análisis multivariado de ordenación

Los componentes principales 1 (CP1) y 2 (CP2) contribuyeron a explicar sólo el 41,61% de la variación. Si bien el mayor aporte correspondió al CP1 (27,74%), para

explicar al menos el 75% de la variación se requirió la consideración de los primeros seis componentes (datos no mostrados).

Al interpretar el gradiente de los caracteres en el plano principal en función de sus cargas sobre los dos primeros componentes se observa que los caracteres de mayor peso en el CP1 fueron: NHF en el ciclo 1, NHF en el ciclo 2, AV en el ciclo 1, NC en el ciclo 1, NV en el ciclo 2, DC en el ciclo 1 y DC en el ciclo 2. Los cinco primeros caracteres numerados aportaron de manera positiva, determinando un gradiente de izquierda a derecha en el tamaño de los órganos que describe cada uno de ellos, mientras que los dos últimos caracteres numerados, DC en el ciclo 1 y DC en el ciclo 2, aportan de manera negativa, determinando un gradiente de derecha a izquierda en el diámetro de los capítulos (Figura 2.17). En el CP2, en cambio, los caracteres de mayor peso fueron: AV en el ciclo 2 y NR en el ciclo 2. Ambos caracteres aportaron de manera positiva, determinando un gradiente de abajo hacia arriba en la altura de la vara y el número de ramas en el segundo ciclo de crecimiento de las plantas (Figura 2.18).

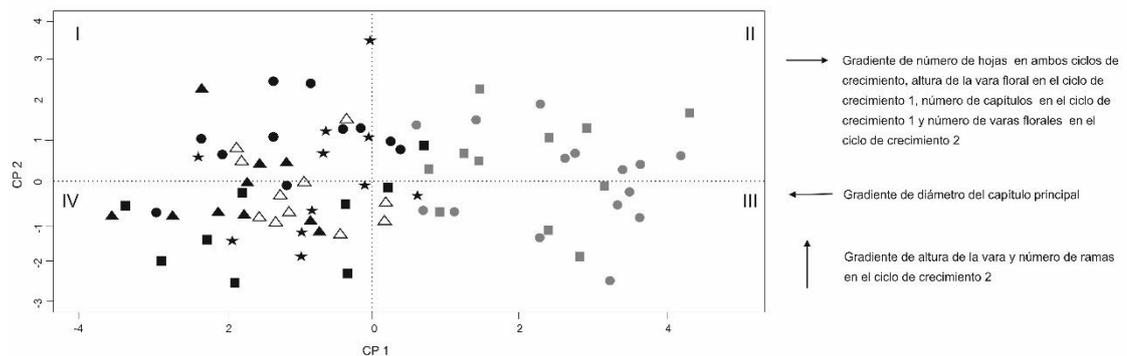


Figura 2.18. Análisis de ordenación a partir de Componentes Principales sobre matriz de correlación en base a 14 caracteres morfológicos. Representación de 83 individuos pertenecientes a siete introducciones de *Chrysolea flexuosa* de la Argentina sobre los dos primeros componentes principales, CP1 y CP2, respectivamente.

Ref.: ■: VdPDFV 26; ●: VdPDFV 45; △: VdPDFV 14; ●: AloEch 1; ★: AloEch 2;

■: AloEch 3; ▲: Nu 1

Nota: aporte de los primeros componentes: 27,74 y 13,87%, respectivamente

Según el resultado del ACP, se produjo un ordenamiento de los individuos en función del CP1. De esta forma, el ordenamiento establecido por dicho componente separó hacia la derecha de la Figura 2.7 -cuadrantes II y III- a los individuos de las introducciones VdPDFV 26 y VdPDFV 45 (Misiones y Corrientes) y, hacia la izquierda –

cuadrantes I y IV- a la mayoría de los individuos de las restantes introducciones (Figura 2.18). Los individuos de las introducciones VdPDFV 26 y VdPDFV 45 se caracterizaron, en general, por presentar en ambos ciclos de crecimiento, mayor cantidad de hojas y menor diámetro de capítulos que los individuos de las restantes introducciones. A su vez, en el ciclo 1, presentaron varas florales más altas y mayor cantidad de capítulos, y en el ciclo 2, mayor número de varas florales que aquellos. Por su parte, el ordenamiento establecido por el CP2 fue más sutil. En la Figura 2.18 se puede apreciar que en el cuadrante I se ubicaron la mayoría de los individuos de la introducción AloEch 1, caracterizados por presentar varas florales más altas y mayor número de ramas en el ciclo 2 que la mayoría de los individuos de las introducciones que ocuparon principalmente el cuadrante IV: AloEch 2, AloEch 3, Nu1 y VdPDFV 14. Los individuos de las introducciones VdPDFV 26 y VdPDFV 45 formaron una nube en los cuadrantes II y III, por lo que, para estos casos, la ordenación por introducción no fue posible.

2.4.3.9. Tamaño del xilopodio

Se constató que en todas las plantas establecidas se produjo un incremento del tamaño del xilopodio de un ciclo de crecimiento al ciclo siguiente (Figura 2.19).

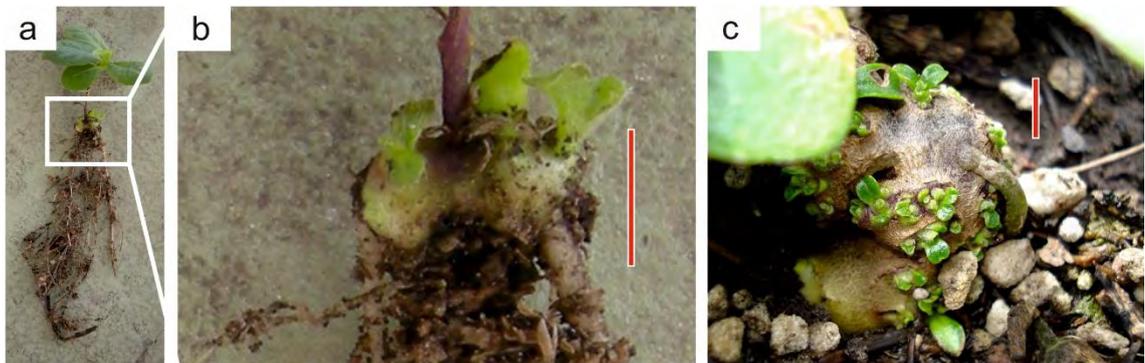


Figura 2.19. Xilopodio de una planta de *Chrysolaena flexuosa* en estado vegetativo en dos ciclos de crecimiento en la UIB, partido de Balcarce, provincia de Buenos Aires. a- b: ciclo de crecimiento 1; c: ciclo de crecimiento 2.

Nota: barra vertical roja= 1 cm.

2.4.3.10. Daños por plagas y/o patógenos

A lo largo del ensayo no se detectaron daños por plagas. Sin embargo, en ambos ciclos de crecimiento se observaron, en todas las introducciones, algunas plantas cuyas

hojas presentaban manchas púrpuras de formas irregulares. Las manchas más antiguas devenían en autotomías. A su vez, sobre los tallos, también se observaron algunas manchas púrpuras (Figura 2.20). A fin de determinar los patógenos se recurrió al Laboratorio de Patología Vegetal de la Unidad Integrada Balcarce.

El patógeno originario de la enfermedad no pudo ser identificado, pero sí las afecciones secundarias. En las cámaras húmedas desde las manchas se observaron signos (micelio y conidios) de *Alternaria* sp., *Fusarium* spp, y *Epicoccum* sp. En los aislamientos también se detectaron zoogreas bacterianas que correspondieron a bacterias Gram (-). Adicionalmente se identificó el género de dichas bacterias por medio de la incubación de las bacterias en medio de cultivo YDC (levadura, dextrosa, carbonato de calcio), King B y la reacción de Hugh y Leifson (oxido/fermentativa). Las bacterias presentes correspondían al género *Erwinia* sp.

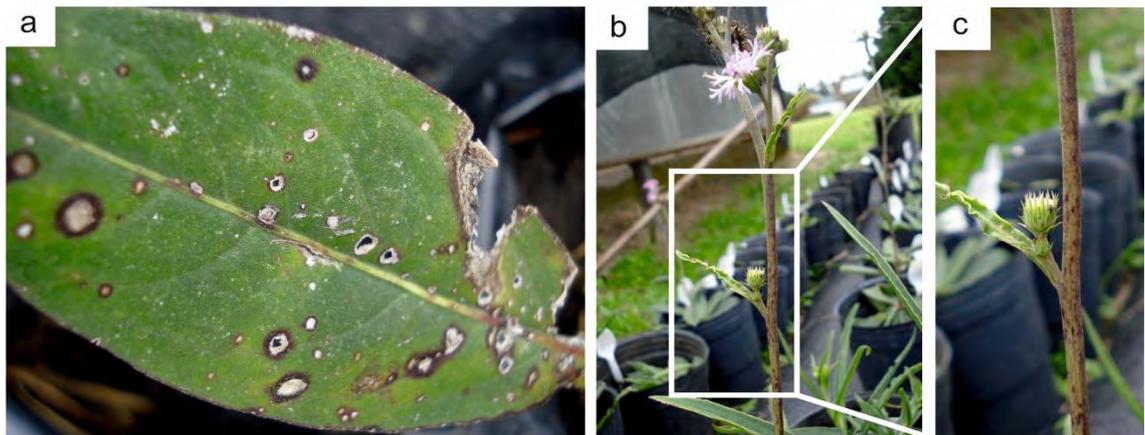


Figura 2.20. Síntomas de plantas enfermas de *Chrysolaena flexuosa*. a: tejido foliar necrosado y con manchas irregulares; b-c: manchas púrpuras en vara floral.

2.5. Discusión

2.5.1. Fenología

La floración es la fase del desarrollo de las plantas con la que se inicia la etapa reproductiva. Esta etapa involucra la diferenciación de meristemas vegetativos a florales que darán como resultado la producción de flores. Resulta primordial que la misma ocurra en el momento donde las condiciones ambientales son óptimas para la producción de semillas a fin de garantizar el éxito reproductivo.

En las plantas superiores, la floración se produce gracias al reconocimiento e integración de señales exógenas y endógenas. Las primeras están vinculadas a las condiciones ambientales, principalmente fotoperíodo y/o temperatura, mientras que las segundas al estado nutricional y al balance hormonal de la planta (Blázquez y Weigel, 2000; Blázquez *et al.*, 2001).

La morfogénesis floral está bajo un estricto control genético (Krizek y Fletcher, 2005). A la fecha son numerosos los genes que se han reconocido como participantes de la “cascada de regulación génica de la floración” (Blázquez *et al.*, 2001; Boss *et al.*, 2004, Soltis *et al.*, 2007). Dichos genes pueden ser agrupados en función del nivel en el cual intervienen en la cascada. El primer grupo está integrado por aquellos genes cuya expresión depende directamente de las señales endógenas y exógenas que desencadenan diversas vías de señalización. El segundo grupo está integrado por los genes de identidad del meristema, que codifican para los factores de transcripción necesarios para iniciar la inducción de los genes del tercer grupo, es decir los genes de identidad de los órganos florales, implicados en la formación de los distintos ciclos de las flores.

Todas las introducciones de *Ch. flexuosa* presentaron plantas con flores en los dos ciclos de crecimiento evaluados por lo que en las mismas, tanto las señales exógenas como las endógenas resultaron favorables, y los distintos nodos de la cascada de regulación génica de la floración siguieron un curso satisfactorio. Sin embargo, también se observó que en ambos ciclos de crecimiento en evaluación, al menos una planta de cada introducción no floreció. Esta situación evidencia que en dichas plantas no se produjo el correcto reconocimiento e integración de las señales exógenas y endógenas necesarias para la floración. Por lo tanto, dichas plantas fueron afectadas por condiciones desfavorables para desencadenar la floración. Por un lado, podrían haber sido afectadas por características microambientales desventajosas para la floración, tales como temperatura inadecuada o propiedades del sustrato, tanto nutricionales como hídricas, deficientes. Por otra parte, características inherentes a las plantas pudieron haber influenciado la ausencia de floración como un incorrecto estado nutricional o la acción de patógenos que pudieran haber afectado la sanidad de las mismas. En consecuencia, uno o incluso varios de los genes involucrados en el control de la floración, específicamente aquellos genes promotores de la misma, pudieron haber resultado reprimidos por factores epigenéticos tales como metilación o cambios en la arquitectura de la cromatina (Blázquez *et al.*, 2001; Boss *et al.*, 2004).

Independientemente de la introducción considerada, el mayor porcentaje de plantas en flor se registró en el segundo ciclo de crecimiento. También se observó que en este ciclo, la floración se registró anticipadamente. En todas las plantas se observó, durante el transcurso del ciclo de crecimiento 2, un mayor tamaño del xilopodio con respecto al tamaño de esta estructura en el ciclo 1. El mayor tamaño de dicho órgano de reserva estaría vinculado a que en el segundo ciclo de crecimiento las plantas presentaron mayor edad y por ende, mayor desarrollo, lo que es esperable en especies perennes. En la Eudicotiledónea *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae) se ha observado que la floración está relacionada a la concentración de sacarosa en floema. Se ha propuesto que existe un mecanismo de integración entre edad de la planta y estado nutricional que determinaría la capacidad de la planta para responder a las señales inductoras de la floración (Blázquez *et al.*, 2001, Eriksson *et al.*, 2006). Dado que a mayor edad de las plantas se espera mejor aclimatación de las mismas al entorno, así como un aumento en los órganos de reserva y por ende en la concentración de fotoasimilados, entre ellos sacarosa, esto podría estar vinculado a la aceleración de la floración y al aumento en el número de plantas de *Ch. flexuosa* bajo evaluación que efectivamente alcanzaron la floración en el segundo ciclo de crecimiento.

2.5.2. Caracterización morfológica

Al realizar la evaluación sobre una especie de ciclo perenne, y en sus primeros ciclos de crecimiento, resulta imposible separar los efectos puros del clima de los efectos puros de la edad de la planta. Por lo tanto, el ambiente de cada ciclo de crecimiento estuvo determinado por el clima reinante en el mismo y por la edad de las plantas. A pesar de esto, la edad explicaría en gran medida ciertos comportamientos observados en la evaluación. Independientemente del hecho de que el ciclo de crecimiento 2 pudiera haber tenido condiciones climáticas que propiciaran un mejor desarrollo de las plantas, es importante destacar que, en dicho ciclo, las plantas tenían mayor edad que en el ciclo anterior, por lo que estaban más desarrolladas y con mayor tamaño de órganos de reserva. Situaciones similares se han constatado en otras especies de ciclo perenne de interés agronómico como “alfalfa” (*Medicago sativa* L.; Fabaceae), “caña de azúcar” (*Saccharum officinarum* L.; Poaceae) o “topinambur” (*Helianthus tuberosus* L.; Asteraceae) (Mariotti, 1986). El aumento del tamaño de los órganos de reserva provoca el desarrollo de mayor número de yemas capaces de originar tallos, hojas y varas florales, explicando el comportamiento general de las plantas de un ciclo de crecimiento

a otro en relación a las variables NHF y NV. En cuanto a la estabilidad de las introducciones en función del ambiente para estos caracteres, la presencia de interacción introducción \times ciclo de crecimiento sumado al cambio en el orden de mérito relativo de las introducciones se podría considerar que las mismas son inestables según el concepto agronómico y el biológico de estabilidad.

La variable NV2 fue una de las variables de peso que, en el ACP, que contribuyó a separar a los individuos de las introducciones de Corrientes y Misiones del resto, que se caracterizaron por exhibir gran número de varas. A pesar de esto, resulta llamativo que para ninguna de las introducciones evaluadas se detectara, para NV, un comportamiento estadísticamente diferente a la media. La gran variabilidad registrada por todas las introducciones en esta variable, principalmente en el ciclo de crecimiento 2, podría explicar este resultado.

Para los caracteres AV, RLAF y DCC, se registró también un comportamiento diferencial de un ciclo a otro, evidenciando gran influencia ambiental. Para estos caracteres resulta difícil asignar a las respuestas obtenidas mayor influencia ambiental debida, o bien al clima reinante, o bien a la edad de las plantas. Por lo tanto, ambos componentes del ambiente habrían de alguna manera propiciado, en el transcurso del ciclo 2, la reducción del ancho foliar que provocara el aumento en la RLAF, así como los incrementos en AV y en la longitud de las corolas y, por lo tanto, en el DCC. Por otra parte, considerando estos caracteres, en general todas las introducciones evaluadas presentaron comportamientos diferenciales entre un ciclo de crecimiento y otro, por lo que se considerarían inestables según el concepto biológico de estabilidad.

Las introducciones de Corrientes y Misiones presentaron, en promedio, los mayores valores para NC, aunque con gran dispersión para esta variable. En el análisis de los caracteres NC y NR no se detectó ni interacción introducción por ciclo de crecimiento, ni diferencias significativas entre ciclos de crecimiento, exhibiendo escasa a nula influencia ambiental. Por lo tanto, estos caracteres se comportaron como de tipo cualitativo, es decir, controlado por uno o por pocos genes mayores, cuya expresión no está influenciada marcadamente por el ambiente y genera variaciones fenotípicas discretas (Falconer, 1986; Fehr, 1987). Para estos caracteres en particular, todas las introducciones se considerarían estables, según el concepto biológico de estabilidad.

En una primera inspección, el ACP exhibió una gran dispersión entre los individuos de las distintas introducciones. Sin embargo, cuando se examinan en detalle los resultados obtenidos mediante este análisis se puede apreciar que los individuos de las

introducciones más próximas al centro de dispersión de la especie, específicamente aquellos de las provincias de Misiones y Corrientes -VdPDFV 26 y VdPDFV 45-, se alejan del resto formando un grupo ligeramente disperso. Por lo tanto, a pesar de la variabilidad intrapoblacional que se observa en este análisis, donde individuos de una misma introducción presentan posiciones distintas en el plano, puede rescatarse un ligero ordenamiento de los mismos a partir del origen de las introducciones. En consecuencia, dicho ordenamiento separa aquellos individuos procedentes de poblaciones del sur de la Provincia de Buenos Aires y de Entre Ríos, de aquellos procedentes de las poblaciones de Misiones y Corrientes.

Resulta importante destacar que tras los distintos análisis efectuados, se detectaron diferencias entre las introducciones de *Chrysolaena flexuosa* para la mayoría de los caracteres evaluados y, por sobre todo, se detectó variabilidad dentro de cada una de las introducciones, inclusive para aquellos caracteres de comportamiento de tipo cualitativo. La variabilidad detectada resulta importante por tres aspectos principales. Por un lado, pone en evidencia que, a pesar de la variabilidad intrapoblacional detectada en cada uno de los análisis efectuados, las diferencias observadas entre individuos de esta especie procedentes de distintas regiones, puede permitir diferenciar las poblaciones en función de algunos atributos fenotípicos cuantitativos de fácil medición. Por otro lado, pone de relieve la importancia de analizar un gran número de ejemplares de esta especie, y en particular de distintas áreas de su distribución y abarcando la totalidad de la misma a la hora de realizar descripciones taxonómicas. Citando algunos ejemplos, en la bibliografía figura que las plantas de esta especie presentan hojas de 5-14 × 1-2,5 cm y capítulos poco numerosos reunidos en 1-3 circinos terminales (Robinson, 1988a; Dematteis, 2014; Dematteis *et al.*, 2017). Sin embargo, en este trabajo se constató que la longitud de las hojas puede variar de 4 a 19 cm; mientras que el ancho puede hacerlo de 0,5 a 8 cm. A su vez, se constató la existencia de ejemplares con hasta 36 capítulos por vara floral y hasta siete ramas o circinos terminales. Por último, la variabilidad detectada resulta un antecedente fundamental al momento de tomar decisiones vinculadas a la inclusión de esta especie en programas de mejoramiento genético. Esta variabilidad de base genética representa el insumo básico necesario para la realización de actividades de selección y/o mejoramiento de esta especie.

2.6 Conclusiones

Respecto a las introducciones argentinas de *Chrysolea flexuosa* analizadas en el Pdo. de Balcarce, Pcia. De Buenos Aires, Argentina, en sus dos primeros ciclos de crecimiento (dos ambientes):

- (1) la evaluación de caracteres morfológicos cuantitativos de interés ornamental empleando análisis univariados con modelos de efectos mixtos permitió detectar variabilidad inter- e intra-poblacional para distintos caracteres y, en algunos casos, detectar interacciones introducción × ambiente. Además, permitió comprobar que algunos caracteres se comportaron como cualitativos, exhibiendo poca a nula influencia ambiental y generando variaciones fenotípicas discretas.
- (2) La caracterización fenológica permitió detectar variabilidad en el momento y duración de la etapa reproductiva, entre introducciones y entre ciclos de crecimiento.
- (3) El empleo de análisis multivariado de ordenamiento por componentes principales permitió establecer grupos de individuos que se vincularon al origen geográfico de las introducciones.

Las cuestiones especificadas anteriormente revelan la gran diversidad genética de *Chrysolea flexuosa*. Los individuos de esta especie presentan notable variabilidad morfológica tanto intra- como inter-poblacional, destacándose así el valor intrínseco de cada población. Dado el valor potencial así como el valor *per se* de esta especie, será imperioso tener en cuenta dicha diversidad a la hora de realizar acciones tendientes a la colección y conservación, tanto *in situ* como *ex situ*, de las poblaciones de esta especie.

3. CAPÍTULO II

Números cromosómicos, contenido de ADN, anomalías meióticas y formación de polen $2n$ en introducciones de la especie silvestre *Chrysolaena flexuosa* (Sims) H. Rob. (Vernonieae, Compositae) de Argentina

3.1. Resumen

Chrysolaena flexuosa es una especie sudamericana de potencial valor ornamental. Para el área principal de su distribución fueron reportados citotipos diploides ($n=10$) y tetraploides ($n=20$); mientras que para el área más austral sólo se dispone de un registro correspondiente a un citotipo hexaploide ($n=30-32ca.$). Para investigar si en poblaciones naturales de *Ch. flexuosa*: (1) la ploidía y la latitud se relacionan positivamente y (2) la poliploidización sexual participó en el origen de los citotipos poliploides, se determinó, en siete introducciones de la Argentina, el número cromosómico, contenido de ADN, tamaño y viabilidad de polen, y se analizó la microesporogénesis en una muestra de ellas. Las introducciones del noreste resultaron diploides y tetraploides; mientras que las introducciones más australes resultaron hexaploides. El nivel de ploidía determinado a partir de conteos cromosómicos coincidió con lo obtenido mediante citometría de flujo; el tamaño genómico se redujo significativamente con la ploidía. Todas las introducciones presentaron variabilidad en viabilidad y tamaño de polen, así como producción de granos grandes (presumiblemente polen $2n$). Esta variabilidad fue acompañada por eventos citológicos anormales en meiosis y en el estadio de tétrada. Los resultados evidencian que aparentemente la ploidía y la latitud estarían relacionados, y que la poliploidización sexual participó en el origen, establecimiento y expansión de las poblaciones de *Ch. flexuosa*.

Palabras claves: citotipos poliploides, tamaño genómico, citometría de flujo, anomalías meióticas, orientación anormal de los husos, polen $2n$.

3.2. Introducción

El aumento de la atención mundial sobre la biodiversidad ha promovido el estudio de especies silvestres (Balmford *et al.*, 2002) ya que brindan distintos servicios ecosistémicos. Por lo tanto, el conocimiento de aspectos básicos de la biología reproductiva de las especies es relevante para los estudios ecológicos y genéticos destinados a la conservación y eventual utilización con fines aplicados.

Vernonieae Cass. (Asteraceae) es una de las principales tribus de las plantas superiores. A esta tribu pertenece el género *Vernonia* Schreb., que incluye especies de valor agronómico e industrial (por ejemplo, *Vernonia galamensis* (Cass.) Less. y *V. amygdalina* Delile) y otras que podrían introducirse potencialmente en el mercado como ornamentales. El género estaba originalmente compuesto por más de 1.000 especies distribuidas en ambos hemisferios (Jones, 1979, 1981; Keeley *et al.*, 2007). Sin embargo, este número fue reducido por Robinson (1987a, b, c; 1988a, b) quien creó nuevos géneros, entre ellos *Chrysolaena* H. Rob.

El género *Chrysolaena* H. Rob. contiene dieciocho especies sudamericanas (Robinson, 1988a; Dematteis, 2014) pero solo siete de ellas crecen en Argentina, principalmente en la región noreste del país. Una de estas especies, *Chrysolaena flexuosa* (Sims) H. Rob. (= *Vernonia flexuosa* Sims), presenta la distribución geográfica más austral conocida para la tribu, ya que las poblaciones naturales de esta especie se han encontrado desde el sur de Brasil hasta el centro de la Argentina, siendo el sudeste de la provincia de Buenos Aires el límite sur de distribución de esta especie (Cabrera, 1963; Dematteis, 2017).

Chrysolaena flexuosa presenta valor ornamental potencial (Echeverría y Alonso, 2012). Se trata de una hierba perenne, silvestre, con xilopodio, que presenta una inflorescencia atípica, con un patrón de ramificación en zig-zag, flores protándricas y una paleta de colores de corola que van desde el blanco puro hasta el púrpura oscuro (Figura 3.1).

Numerosos estudios se han llevado a cabo para determinar los números cromosómicos en poblaciones naturales de *Ch. flexuosa*, habiéndose registrado citotipos diploides ($2n=2x=20$) y tetraploides ($2n=4x=40$) (Dematteis, 2009; Vía do Pico y Dematteis, 2012, 2013). Sin embargo, esos estudios no incluyeron poblaciones de la provincia de Buenos Aires, una región agrícola en la que la especie se ha encontrado solo en el Sistema serrano de Tandilia, donde no se ha informado que otras especies del género *Chrysolaena*, o incluso de la tribu Vernonieae, crezcan en simpatria

(Cabrera, 1963; Frangi, 1975; Alonso *et al.*, 2009, Dematteis, 2017). Para ese Sistema serrano solo hay un registro de un citotipo hexaploide, con el número de cromosomas determinado en meiosis ($n=30-32$ ca.) (Hunziker *et al.*, 1990).

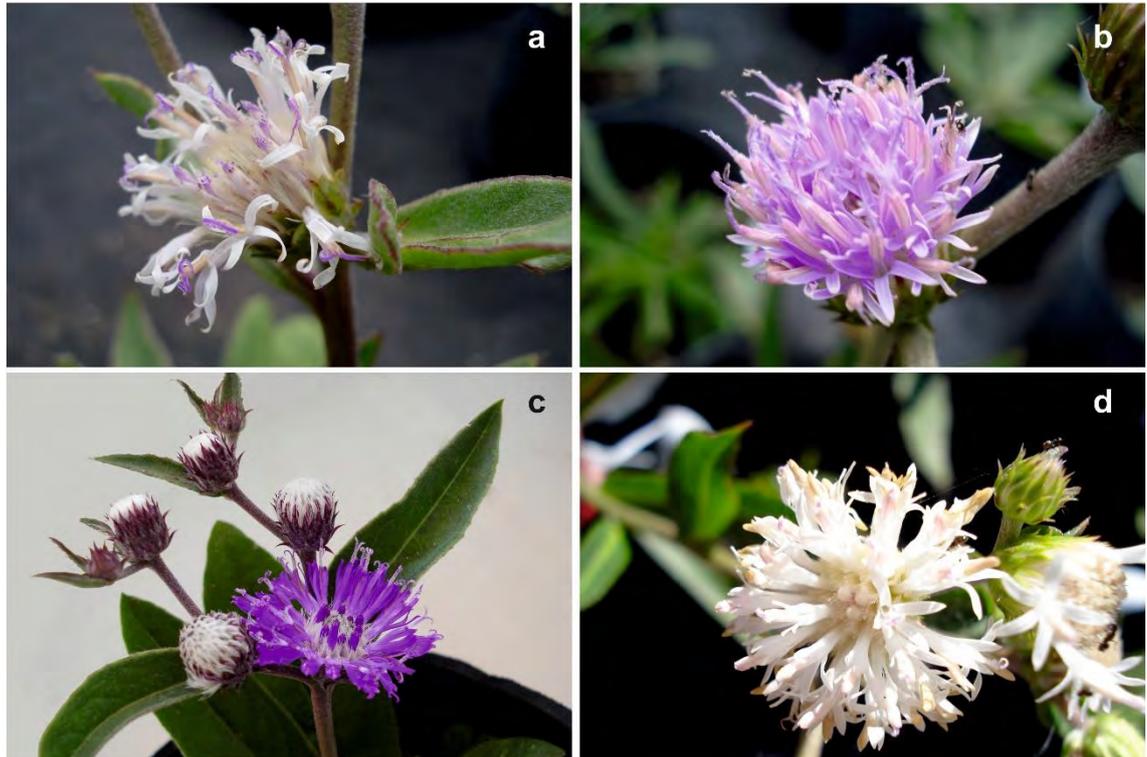


Figura 3.1. Inflorescencias de *Chrysolea flexuosa* con diferentes colores de flores: a) corolas blancas y pistilos lilas, b) corolas y pistilos de color lila, c) corolas de color púrpura oscuro y pistilos de color lila, d) corolas y pistilos blancos.

La poliploidía es un fenómeno generalizado en el reino vegetal (Ramsey y Schemske, 1998), con un papel relevante en el origen, evolución y distribución geográfica de las plantas superiores. Los poliploides y sus contrapartes diploides a menudo ocupan diferentes hábitats. Por lo tanto, se ha propuesto que, siendo novedades evolutivas, los poliploides son superiores colonizadores que los diploides (Levin, 1983, Otto y Whitton, 2000, Soltis y Soltis, 2000). Los poliploides pueden originarse por poliploidización asexual, mediante duplicación cromosómica somática, o por poliploidización sexual, mediante el funcionamiento de gametos $2n$ funcionales (gametos numéricamente no reducidos o gametofitos con el número de cromosomas del esporofito) formados por duplicación cromosómica pre- o post-meiótica, o por mecanismos meióticos de restitución nuclear (Mok y Peloquin, 1975a; Veilleux *et al.*, 1982; Camadro, 1986; Carputo *et al.*, 2003).

Los niveles de ploidía generalmente se determinan a partir de recuentos cromosómicos en la mitosis o en la meiosis. Sin embargo, la estimación del contenido de ADN nuclear (2C ADN) mediante citometría de flujo ha sido sugerida como una alternativa simple y rápida para examinar ploidía a gran escala, particularmente en grupos de plantas con cromosomas pequeños o con cromosomas numerosos (Roux *et al.*, 2002; Doležel *et al.*; Suda *et al.*, 2007). La suposición básica en la asignación de niveles de ploidía a muestras individuales de plantas mediante esta técnica, se basa en que los incrementos en el contenido de ADN son el resultado de incrementos en el número de cromosomas. En ese sentido, se ha propuesto que se espera que los taxones o poblaciones tetraploides y hexaploides tengan, respectivamente, el doble y el triple de contenido de ADN en relación a los diploides (Torrell y Vallés, 2001; Doležel *et al.*, 2007; Suda *et al.*, 2007).

Para investigar si en poblaciones argentinas de *Chrysolaena flexuosa* la ploidía y la latitud están positivamente relacionadas, y si la poliploidización sexual podría haber participado en el origen de los citotipos poliploides, se determinó el número de cromosomas, el contenido de ADN, la viabilidad y tamaño del polen, y se analizó la microsporogénesis en introducciones de esta especie pertenecientes al rango de distribución noreste-sudeste de la Argentina, siguiendo una transecta de aproximadamente 1.000 km. Además, se determinaron los niveles de ploidía por conteos cromosómicos en punta de raíces y por citometría de flujo para determinar la confiabilidad de la última técnica para su aplicación en estudios citogeográficos de esta especie.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Material vegetal

Siete introducciones de *Chrysolaena flexuosa* (Tabla 2.1) se usaron en el estudio. Las semillas de las introducciones de las provincias de Misiones, Corrientes y Entre Ríos (Figura 2.1) fueron amablemente provistas por el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), Argentina. Las de la provincia de Buenos Aires (Figura 2.1) fueron recolectadas para este estudio y están conservadas en la Unidad Integrada Balcarce: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-Facultad de Ciencias Agrarias, Buenos Aires, Argentina (UIB). Las introducciones cubren el rango de distribución de la especie en la Argentina, caracterizado por diversos regímenes de temperatura y precipitación

(Figura 3.2 a, b). Los especímenes de referencia se depositaron en el Herbario de la Unidad Integrada Balcarce (BAL). Las plantas fueron obtenidas a partir de semillas y en la etapa de 3 hojas, las plántulas se trasladaron en macetas individuales con una mezcla de suelo esterilizado, turba y perlita (3:1:1, v/v/v), y se cultivaron en invernáculo sin suplementación de luz. En primavera, las plantas en macetas se colocaron al aire libre en un lote de la UIB (37° 45' 48" S, 58° 17' 60" O).

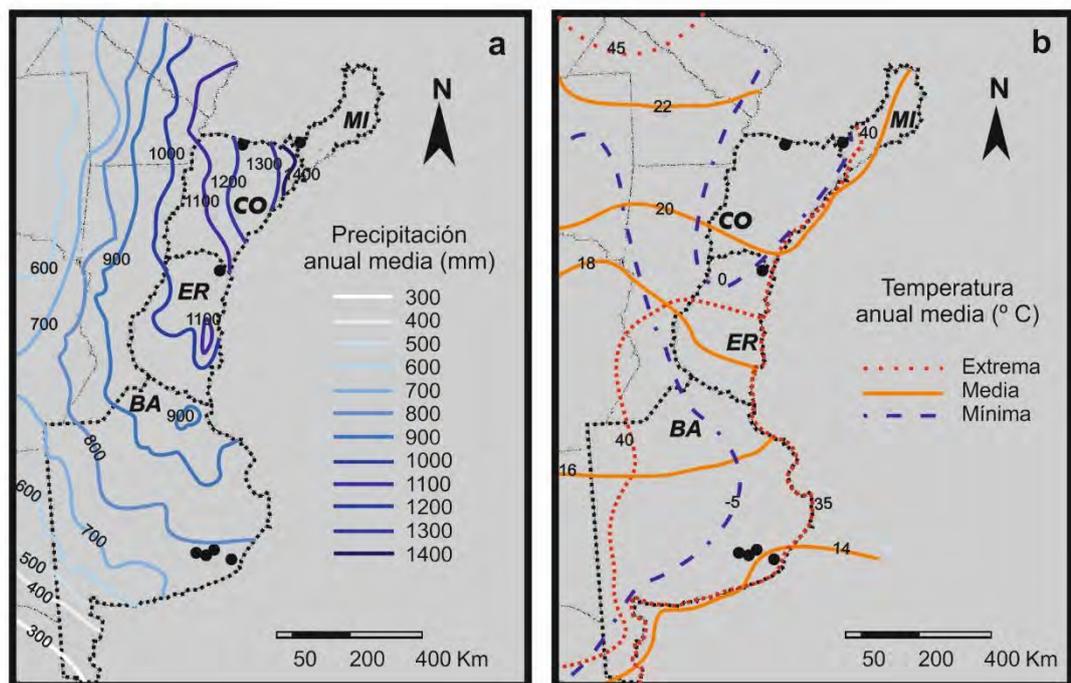


Figura 3.2. Precipitación anual media (a) y temperatura (b) del área de distribución de *Chrysolaena flexuosa* en Argentina y áreas geográficas adyacentes (adaptado de Mozo, 2016).

3.3.2. Números cromosómicos

Se realizaron conteos cromosómicos en puntas de raíces, en al menos cinco plantas por introducción, pretratadas con 8-hidroxiquinoleína 0,002 M, durante 3 a 4 h, fijadas en etanol 96°:ácido acético glacial (v/v, 3:1) durante al menos 24 h, hidrolizadas en HCl 1N a 62° C durante 12 min y teñidas con fucsina básica. Posteriormente se aplastaron sobre un portaobjetos de vidrio y se observaron bajo microscopio óptico.

3.3.3. Estimación del nivel de ploidía por citometría de flujo

Se utilizaron hojas frescas para estimar el contenido de ADN de las plantas. Para esto se empleó un citómetro de flujo (CyFlow Ploidy Analyzer Cytometer, Partec) del Instituto de Floricultura del INTA de Castelar, según la propuesta de Doležl y Göhde (1995). Los núcleos celulares se tiñeron con yoduro de propidio (IP); *Secale cereale* L. cv. 'Daňkovské', 2C DNA = 16.19 pg (Doležl y Bartos 2005) se usó como estándar interno. Para cada muestra de planta individual se picaron 5 cm² de hoja con 5 cm² de hoja del estándar usando una hoja de afeitar, en placa de Petri con 0,5 ml de solución tampón Otto I (ácido cítrico 0,1 M y 0,5% v/v de Tween 20). Cada muestra se filtró a través de una malla de nailon (50 µm) y luego se añadieron 0,5 ml de solución tampón Otto II (Na₂HPO₄·12H₂O 0,4 M) suplementando con IP y RNasa. Las muestras se incubaron en la oscuridad, durante 45 min (15 min a temperatura ambiente y 30 min a 4° C).

Se analizaron nueve plantas individuales por introducción y se realizaron tres estimaciones del contenido de ADN por cada una de ellas (2.000-6.000 núcleos por estimación). El contenido de ADN se estimó a partir de histogramas de fluorescencia (Figura 3.3). El análisis de los datos se realizó con el software Flowing 2.5.1 (www.flowingsoftware.com). El contenido de 2C ADN se determinó de acuerdo a Doležl *et al.* (2007) de la siguiente manera:

$$\text{Valor 2C de la muestra (ADN pg)} = \text{Valor 2C del estándar (pg)} \times \frac{\text{Posición promedio del pico 2C de la muestra}}{\text{Posición promedio del pico 2C del estándar}}$$

Una planta de cada introducción de *Ch. flexuosa*, cuyo número de cromosomas se determinó previamente en mitosis, se incluyó en el análisis como control. Con el fin de detectar individuos con niveles de ploidía potencialmente diferentes a los de su misma introducción, la media del contenido de 2C ADN de cada planta individual se comparó con la media del contenido de 2C ADN de su correspondiente control, mediante la prueba de Dunnett ($\alpha = 5\%$).

En cada planta individual también se estimó el tamaño del genoma (1Cx). Para esto se dividió el contenido de 2C ADN por el nivel de ploidía (Leitch y Bennett 2004). Los datos del contenido de 2C ADN y 1Cx se sometieron a un análisis de varianza, usando un diseño completamente aleatorizado, con introducciones como tratamientos y plantas individuales como repeticiones. La prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha=5\%$)

se realizó para detectar diferencias estadísticamente significativas entre las introducciones.

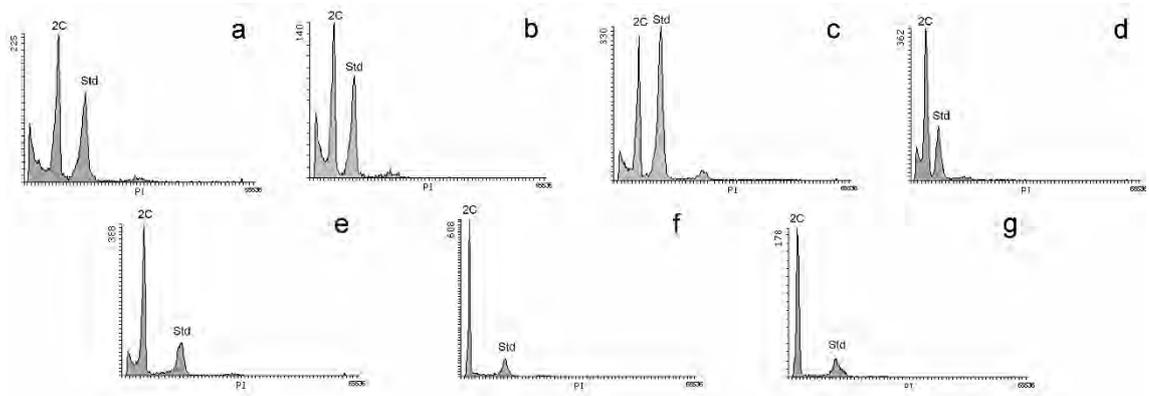


Figura 3.3. Histogramas de fluorescencia de núcleos aislados teñidos con IP en individuos de siete introducciones de *Chrysolaena flexuosa* y un patrón interno. a) AloEch 1, b) AloEch 2, c) AloEche 3, d) Nu 1, e) VdPDFV 14, f) VdPDFV 26, g) VdPDFV 45.

Ref.: 2C indica picos G0/G1 de muestras de *Ch. flexuosa* y Std indica picos G0/G1 del estándar *Secale cereale* L. cv. 'Daňkovské'.

3.3.4. Viabilidad y tamaño del polen

Durante la floración, se removieron de tres a cinco flores, de 15 a 21 plantas por introducción, para estimar la viabilidad y el tamaño del polen. Por muestra se registraron, en al menos cinco campos del microscopio, 250 granos de polen teñidos con carmín acético (3%). Los granos bien teñidos, turgentes y bien formados se consideraron viables, mientras que los que tenían protoplasma contraído o tinción tenue se consideraron inviables. En aquellas muestras en las que el tamaño de los granos de polen fue heterogéneo, se les asignó, a los granos individuales, alguna de las siguientes categorías: n (tamaño medio del grano de polen en la muestra), $>n$ (1,26 veces el diámetro del polen n o más) y $<n$ (diámetro del polen inferior a n) (Larrosa *et al.*, 2012).

3.3.5. Análisis meiótico

En la floración, los botones florales inmaduros en distintas etapas de desarrollo se fijaron en una solución de etanol 96%:ácido acético glacial (3:1, v/v) durante 24 h y luego

se transfirieron a etanol al 70% con el fin de conservarlos hasta su uso. Los botones se sumergieron en solución de ácido acético glacial al 45% y las anteras de cada primordio floral se removieron en portaobjetos, bajo una gota de carmín acético (0,5%), con ayuda de aguja histológica, a fin de liberar meiocitos. Las observaciones se realizaron en al menos una planta por introducción, bajo microscopio óptico, comenzando desde las fases más avanzadas y retrocediendo hacia las fases iniciales si se detectaban anomalías meióticas.

3.4. Resultados

3.4.1. Números cromosómicos

Los recuentos de cromosomas en puntas de raíces revelaron que las plantas analizadas de VdPDFV 26 y VdPDFV 45 eran $2n=2x=20$, las de VdPDFV 14 eran $2n=4x=40$, y las de AloEch 1, AloEch 2, AloEch 3 y Nu 1 eran $2n=6x=60$ (Figura 3.4).

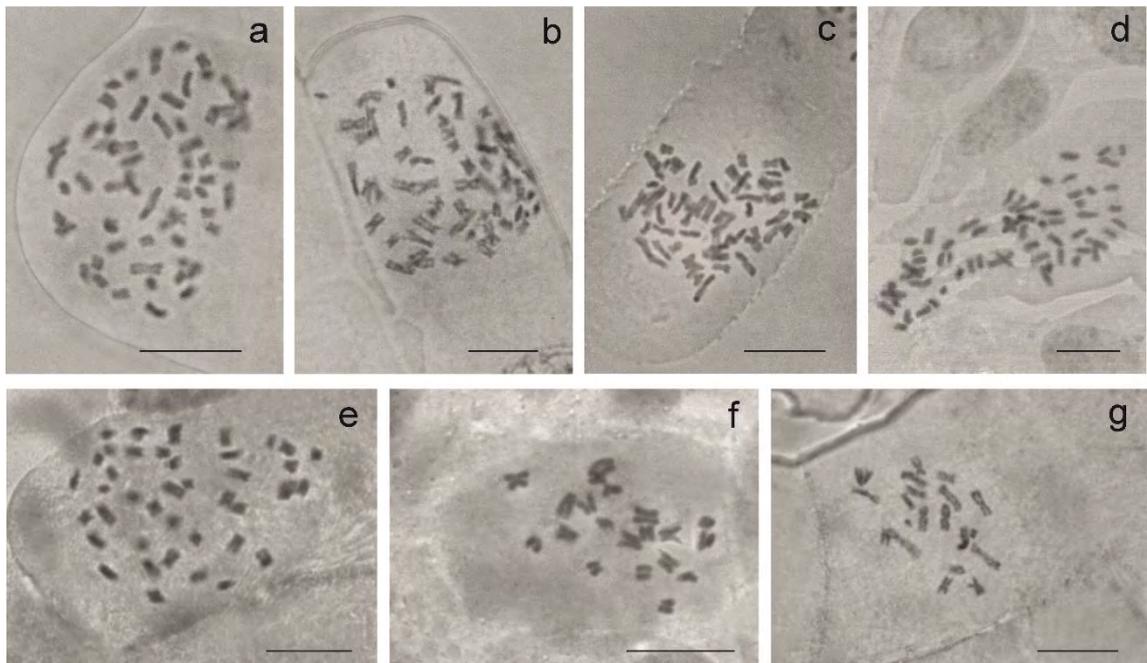


Figura 3.4. Metafases mitóticas en plantas de siete introducciones de *Chrysolea flexuosa*. a) AloEch 1 ($2n=6x=60$); b) AloEch 2 ($2n=6x=60$); c) AloEch 3 ($2n=6x=60$); d) Nu1 ($2n=6x=60$); e) VdPDFV 14 ($2n=4x=40$); f) VdPDFV 45 ($2n=2x=20$); g) VdPDFV 26 ($2n=2x=20$).

Ref.: barra de escala, 10 μ m.

3.4.2. Estimación del nivel de ploidía por citometría de flujo

Los números cromosómicos, el contenido medio de 2C ADN, y la media de 1Cx de cada introducción se encuentran en la Tabla 3.1, junto con el número de plantas en las que se determinaron los números cromosómicos. El contenido medio de 2C ADN por introducción varió entre 2,95 y 8,65. El coeficiente de variación (CV) para los picos de los histogramas varió entre 5% y 8%.

Al analizar el contenido de 2C ADN no se detectaron diferencias significativas con la prueba de Dunnett ($\alpha=5\%$) entre los controles y las plantas evaluadas de cada introducción. Sin embargo, se detectaron diferencias significativas ($p<0,0001$) entre las introducciones, que se separaron mediante la prueba de Tukey en tres grupos principales: VdPDFV 45 y VdPDFV 26, con un contenido medio de ADN 2C de 2,95 pg, VdPDFV 14 con un contenido medio de 2C ADN de 5,83 pg y finalmente AloEch 1, AloEch 2, AloEch 3 y Nu 1 con un contenido medio de 2C ADN de entre 8,62 y 8,65 pg.

Tabla 3.1. Números cromosómicos y contenido medio de 2C ADN de siete introducciones de *Chrysolea flexuosa* de la Argentina.

Introducción	Números cromosómicos (determinados en mitosis)	Contenido medio de 2C ADN (pg) \pm D.E.	Contenido medio de 1Cx (pg) \pm D.E.
AloEch 1	2n=6x=60 (6)	8,63 \pm 0,16 a	1.44 \pm 0.03 a
AloEch 2	2n=6x=60 (7)	8,65 \pm 0,08 a	1.44 \pm 0.01 a
AloEch 3	2n=6x=60 (5)	8,62 \pm 0,13 a	1.44 \pm 0.02 a
Nu 1	2n=6x=60 (5)	8,63 \pm 0,09 a	1.44 \pm 0.01 a
VdPDFV 14	2n=4x=40 (6)	5,83 \pm 0,10 b	1.46 \pm 0.02 b
VdPDFV 45	2n=2x=20 (6)	2,95 \pm 0,10 c	1.47 \pm 0.05 c
VdPDFV 26	2n=2x=20 (5)	2,95 \pm 0,05 c	1.47 \pm 0.03 c

Nota: el número de plantas analizadas para determinar el número de cromosomas se indica con paréntesis. Las introducciones con letras diferentes tienen contenidos medios de 2C ADN o de 1Cx significativamente diferentes entre sí ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$, respectivamente). D.E.: desvío estándar

Con respecto a 1Cx, también se detectaron diferencias significativas ($p<0,0001$) entre las introducciones, que se pudieron separar mediante la prueba de Tukey en tres grupos coincidentes con el nivel de ploidía de sus correspondientes controles internos.

Se observó una disminución significativa en valor 1Cx con el aumento de la ploidía: 1,47 pg para VdPDFV 45 y VdPDFV 26, 1,46 pg para VdPDFV 14 y 1,44 pg para AloEch 1, AloEch 2, AloEch 3 y Nu 1.

3.4.3. Viabilidad y tamaño del polen

Se observó variabilidad para la viabilidad y el tamaño de los granos de polen en todas las introducciones (Figura 3.5 y 3.6). El porcentaje de polen viable, estimado indirectamente por tinción en 15 a 21 plantas individuales por introducción, varió entre y dentro de las introducciones, desde 18,8% en una planta de la introducción 2x VdPDFV 26 a 100% en dos plantas de la introducción 6x AloEch 2 y una de la introducción 6x AloEch 1. Las introducciones 2x VdPDFV 26 y 6x Nu 1 exhibieron el menor porcentaje medio de polen viable (65,0% y 71,6%, respectivamente) y la mayor variabilidad para ese parámetro (D.E.= 23,9% y 24,9%, respectivamente). Por otro lado, las introducciones 6x AloEch 2 y 6x AloEch 1 tuvieron el mayor porcentaje medio de polen viable (92,3% y 87,7%, respectivamente) y la variabilidad más baja para ese parámetro (D.E. = 8,2% y 10,9%, respectivamente).

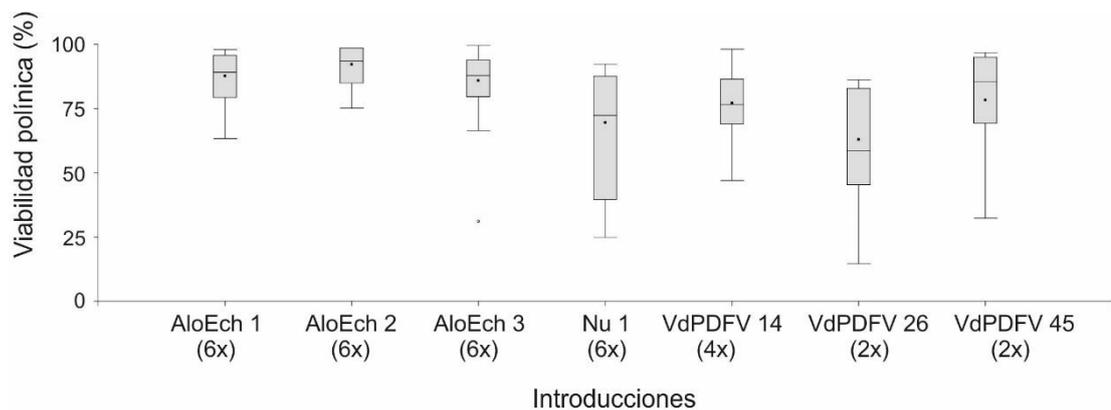


Figura 3.5. Viabilidad del polen (%) en 15-21 plantas individuales de cada una de las siete introducciones de *Chrysolea flexuosa*.

Ref.: Caja = 50% de los datos centrales; línea dentro de la caja = mediana; puntos negros = media; punto blanco: valor atípico.

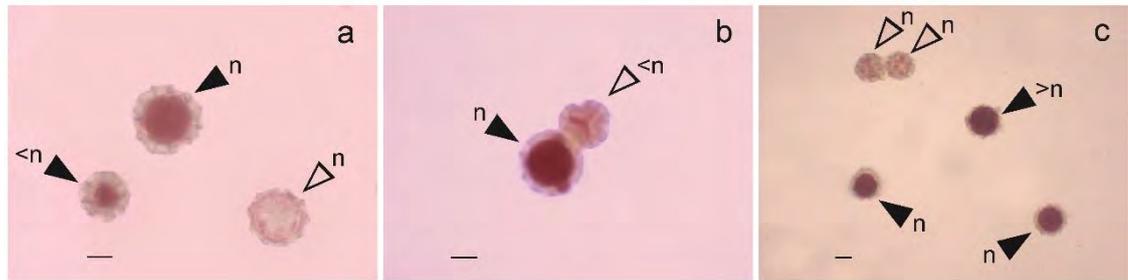


Figura 3.6. Ejemplos de granos de polen viables (flechas llenas) e inviables (flechas vacías) en *Chrysolea flexuosa* de acuerdo con el tamaño. a) Normal (n) y pequeño (<n); b) normal (n) y pequeño (<n); c) normal (n) y 2n (>n).

Ref.: barra de escala, 20 μ m.

Todas las plantas analizadas, independientemente de la ploidía, produjeron polen de tamaño heterogéneo. Se consideró que el tamaño medio de los granos de polen de cada muestra representó la categoría n, mientras que los tamaños >n y <n se tomaron como indicaciones de la formación de gametofitos con números de cromosomas que difieren de los $n=x$ esperados en diploides, $n=2x$ en tetraploides y $n=3x$ en hexaploides (Larrosa *et al.*, 2012). El porcentaje de polen viable representado por granos de tamaño n varió entre 77,3% en la introducción 6x Nu 1 a 92,0% en la introducción 6x AloEch 2 (Figura 3.7). La introducción 6x AloEch 2 presentó valores similares de granos de polen de tamaños <n y >n (3,9% y 4,1% respectivamente), mientras que el resto de las introducciones presentaron un porcentaje ligeramente mayor de granos de polen <n en relación a los >n (Figura 3.7). Por otro lado, en todas las introducciones se detectaron granos de polen inviables que fueron discriminados en cuatro categorías, según el tamaño y el tipo de protoplasma, de la siguiente manera: normal y con protoplasma contraído, pequeño y con protoplasma contraído, normal y vacío, y pequeño y vacío (Figura 3.8). Se observó variabilidad entre y dentro de las introducciones para las diferentes categorías de granos de polen inviables.

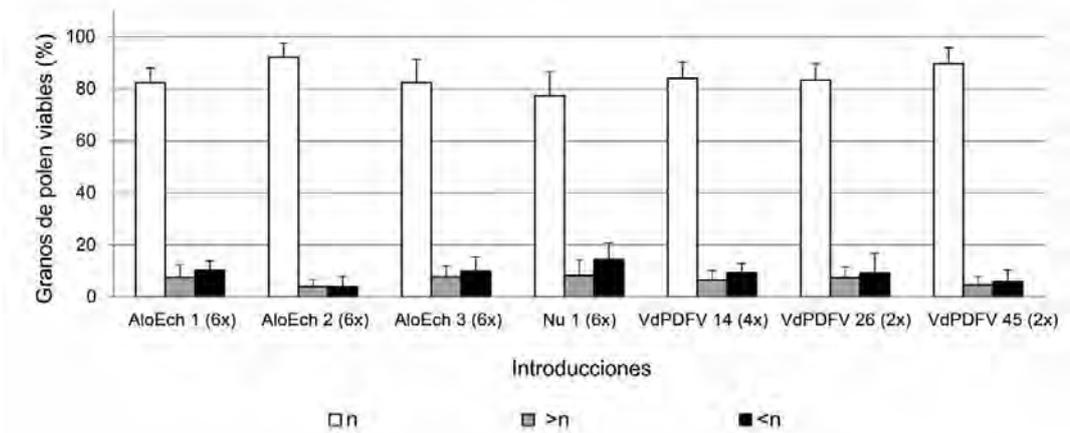


Figura 3.7. Valores medios de granos de polen viables (%) en siete introducciones de *Chrysolaela flexuosa* discriminados en tres categorías según el tamaño: normal (n), 2n (>n) y pequeño (<n).

Nota: para cada introducción, el porcentaje de granos de polen viables en cada categoría se calculó promediando los porcentajes registrados (para la misma categoría) en 15-21 plantas individuales.

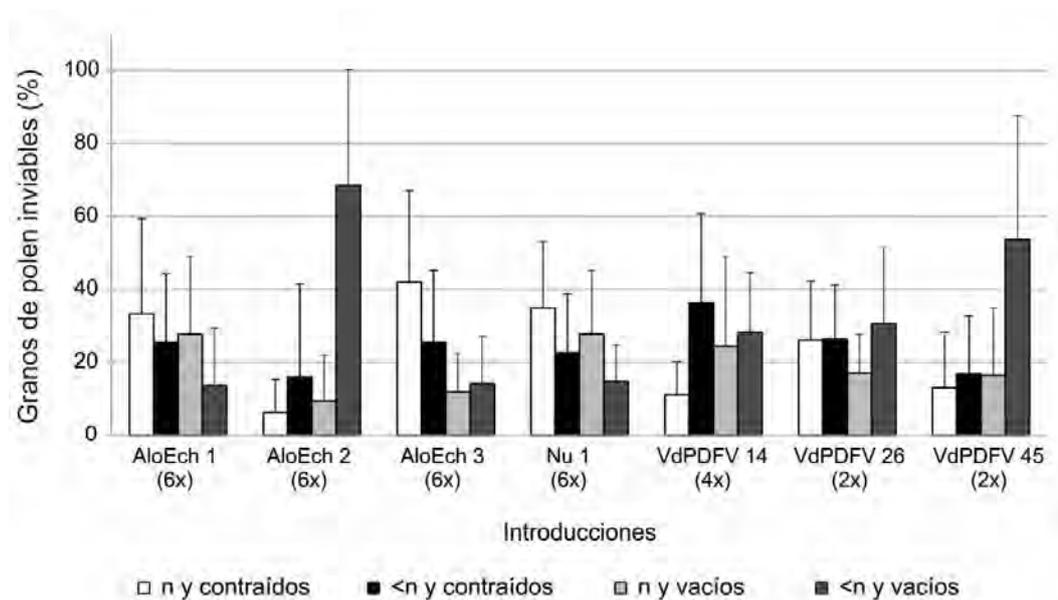


Figura 3.8. Valores medios de granos de polen inviables (%) en siete introducciones de *Chrysolaela flexuosa* discriminados en cuatro categorías según tamaño y tipo de protoplasma: normal (n) y contraído, pequeño (<n) y contraído, normal y vacío, y pequeño (<n) y vacío.

Nota: para cada introducción, el porcentaje de granos de polen inviables en cada categoría se calculó promediando los porcentajes registrados (para la misma categoría) para 15-21 plantas individuales.

3.4.3. Análisis meiótico

Se observaron tétradas normales en todas las plantas analizadas. Sin embargo, con excepción de la planta 16 de la introducción 6x Nu 1, también se observaron tétradas anormales con células de tamaño desigual o con disposición espacial no tetraédrica (Tabla 3.2, Figura 3.9k, m, n, p). El mayor porcentaje de tétradas anormales se observó en las dos plantas analizadas de la introducción 2x VdPDFV 26 (25,6% y 27,3%, respectivamente). En las ocho plantas bajo análisis también se detectaron tríadas en 18% de los 473 meiocitos analizados (Tabla 3.2, Figura 10 n, p), con porcentajes que variaron entre 2,7% en la planta 4 de la introducción 2x VdPDFV 26 y 15,4% en la planta 23 de la introducción 2x VdPDFV 45.

Tabla 3.2. Porcentaje de tríadas y tétradas en meiosis de plantas individuales (genotipos) de siete introducciones argentinas de *Chrysolea flexuosa*.

Introducción	Ploidía	Denominación de la planta	Meiocitos (no.)	Tríadas (%)	Tétradas (%)	
					Normales	Anormales
AloEch 1	Hexaploide	2	66	4,5	92,4	3,1
AloEch 2	Hexaploide	7	32	6,2	84,4	9,4
AloEch 3	Hexaploide	27	48	8,3	87,5	4,2
Nu 1	Hexaploide	16	26	7,7	92,3	0
VdPDFV 14	Tetraploide	20	120	10,8	88,3	0,9
VdPDFV 26	Diploide	1	55	12,7	60	27,3
	Diploide	4	74	2,7	71,7	25,6
VdPDFV 45	Diploide	23	52	15,4	80,8	3,8

Otras anomalías detectadas fueron: cromosomas rezagados y migración cromosómica precoz en Metafase I en todas las plantas analizadas (Figura 3.9b); un puente cromosómico (Figura 3.9d) y Metafase II anormal (Figura 3.9f, h) en la introducción 6x AloEch 2. Por otro lado, una planta de la introducción 2x VdPDFV 26 presentó cromosomas rezagados en Metafase II y cromosomas fuera de placa en Telofase II. Además, en las introducciones 4x VdPDFV 14, 2x VdPDFV 26 y 6x AloEch 3 se detectaron husos paralelos en Metafase II (Figura 3.9g).

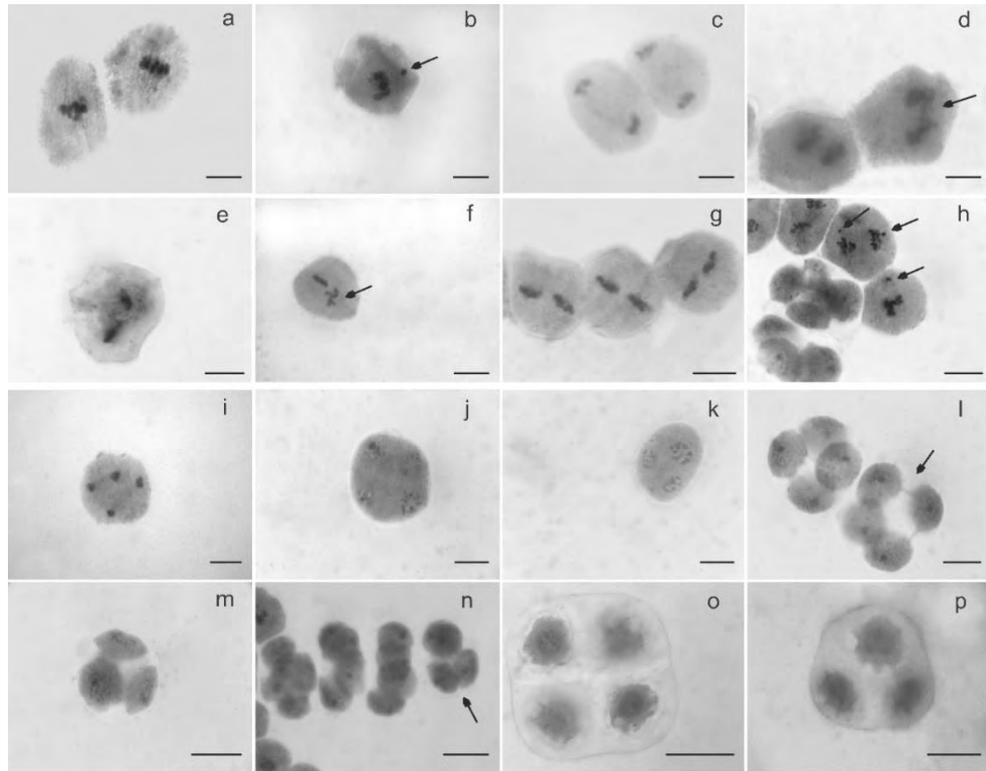


Figura 3.9. Ejemplos de estadios de la meiosis en introducciones de *Chrysoleona flexuosa*. a) Metafase I normal; b) cromosoma rezagado en Metafase I (flecha); c) fin de Anafase I normal; d) puente cromosómico en Anafase I (flecha); e) Metafase II normal; f) Metafase II anormal (flecha); g) husos paralelos en Metafase II; h) Metafase II anormal con cromosomas rezagados (flechas); i) fin de Anafase II normal; j) Telofase II normal; k) Telofase II anormal con un grupo de cromosomas grande y otros dos pequeños; l) una tétrada normal y otra tétrada con citomixis (flecha) en estadio de tétrada; m) tríada en la etapa de tétrada; n) tríada (flecha) y tétradas con disposición anormal en estadio de tétrada; o) tétrada en estadio de tétrada; p) triada.

Ref.: barra de escala, 20 μ m.

3.5. Discusión

3.5.1. Números cromosómicos, niveles de ploidía y contenido de ADN

Los números cromosómicos determinados en las tres introducciones del noreste de la Argentina ($2n=20$ para VdPDFV 26 y VdPDFV 45, y $2n=40$ para VdPDFV 15) fueron consistentes con los reportes previos para otras introducciones de la misma región y de

Uruguay, Bolivia y Brasil (Ruas *et al.*, 1991; Dematteis, 2009; Via do Pico y Dematteis, 2012). Por otro lado, los determinados en las cuatro introducciones de la zona sureste fueron consistentes con el único registro, n=30-32 ca., para una población de Tandil, en el Sistema serrano de Tandilia (Hunziker *et al.*, 1990), aunque el número de plantas analizadas en ese estudio no fue informado.

En cuanto a los resultados obtenidos a partir de la técnica de citometría de flujo, el CV para los picos de los histogramas (5% y 8%) se consideran tolerables para las estimaciones del nivel de ploidía, cuando se realizan repeticiones dentro de individuos y se adquieren más de 1.000 núcleos por pico (Suda *et al.*, 2007). Así, de acuerdo con el contenido medio de 2C ADN, se asignaron los siguientes niveles de ploidía: diploide (VdPDFV 14 y VdPDFV 45), tetraploide (VdPDFV 26) y hexaploide (AloEch 1, AloEch 2, AloEch 3 y Nu 1).

Solo existe en la bibliografía un informe sobre el contenido de ADN de *Ch. flexuosa* aportado por Via do Pico y Dematteis (2013), quienes trabajaron con una introducción diploide del noreste de la Argentina y con una introducción tetraploide de Uruguay. El contenido de 2C ADN estimado por estos autores fue 11% y 17,5% mayor que el contenido de 2C ADN estimado para las introducciones diploides y tetraploides analizadas en el presente estudio, respectivamente. A su vez, estos autores también encontraron que el valor 1Cx aumentaba con el nivel de ploidía. Las discrepancias entre los resultados de ambos estudios podrían deberse a diferencias genéticas y/o metodológicas. En su publicación, Via do Pico y Dematteis (2013) no mencionan ni el número de plantas analizadas ni el CV de los picos de los histogramas; además, utilizaron otros estándares de referencia, seleccionados según la ploidía: *Paspalum intermedium* Munro "Sch 28857" para la introducción diploide y *P. dilatatum* Poir. "Chirú" para la tetraploide.

En el presente trabajo, el contenido de 2C ADN de las introducciones tetraploides y hexaploides fue 1,9 y 2,9 veces mayor que el contenido de la introducción diploide, respectivamente, en lugar de ser el doble y el triple como se esperaba, según la propuesta de varios autores para plantas superiores en general (Torrell y Vallés, 2001; Doležel *et al.*, 2007; Suda *et al.*, 2007). Las diferencias observadas entre lo esperado y lo estimado se pueden apreciar mejor al considerar la disminución significativa en el valor 1Cx con el aumento de la ploidía. La disminución del tamaño del genoma es un fenómeno generalizado entre poliploides (Leitch y Bennett, 2004; Leitch y Leitch, 2013). En la familia Asteraceae, se han documentado reducciones del contenido de 1Cx con

aumento de la ploidía en varios géneros, entre ellos, *Artemisia*, *Centaurea*, *Colymbada*, *Cyanus*, *Hieracium* y *Lessingianthus* (Bancheva y Greilhuber, 2006; Pellicer *et al.*, 2007; Chrtek *et al.*, 2009; Angulo y Dematteis, 2013), e incluso en la especie *Chrysolaena cognata* (Via do Pico y Dematteis, 2013).

La variación en el contenido de ADN tras la poliploidización podría ser causada por la pérdida o ganancia de material genético, en respuesta a reordenamientos cromosómicos, luego del *shock* genómico causado por la combinación genómica del híbrido (McClintock, 1984). Varios autores han sugerido que la reducción del genoma puede producirse por eliminación no aleatoria de secuencias codificantes y no codificantes, eliminación de retroelementos, ganancia o pérdida de cromosomas o genomas completos, patrones alterados de expresión génica y modificaciones epigenéticas (Feldman y Levy, 2005; Ma y Gustafson, 2006; Jones y Langdom, 2013; Leitch y Leitch, 2013). Los valores 1Cx estimados en el presente trabajo, combinados con los recuentos cromosómicos, sugerirían que las diferencias observadas entre lo esperado y lo estimado respecto al contenido de ADN son el resultado de reordenamientos cromosómicos con pérdida de material genético, pero no de aneuploidía. Las secuencias de ADN no codificantes constituyen la fracción principal de muchos genomas eucarióticos (Leitch y Bennett, 2004) y se ha demostrado que este tipo de secuencias pueden eliminarse en plantas tras la formación de poliploides (por ejemplo, Ozkan *et al.*, 2001; Shaked *et al.* 2001). La pérdida de ADN por poliploidización en *Ch. flexuosa* podría estar relacionada con deleciones de secuencias de ADN no codificantes, ya que las funciones vitales no parecen haberse visto afectadas en los citotipos poliploides.

3.5.2. Viabilidad del polen

Tres de las introducciones hexaploides -AloEch 2, AloEch 3 y AloEch 1- presentaron el porcentaje más alto de polen viable (> 85%) mientras que la introducción diploide VdPDFV 26 presentó el más bajo (62,3%). Via do Pico y Dematteis (2012), trabajando con una población diploide de la misma región geográfica, informaron un valor de viabilidad del polen del 92,1%. Estas diferencias en la viabilidad del polen podrían deberse a la composición genética de las poblaciones, las condiciones ambientales de crecimiento y/o los aspectos metodológicos de cada estudio. En tal sentido, Via do Pico y Dematteis (2012) observaron un total de 342 granos de polen, pero no refirieron el número de plantas individuales analizadas, mientras que en el presente trabajo se

analizaron al menos 15 plantas/introducción, es decir, un mínimo de 3.750 granos de polen. El análisis de 250 granos de polen en cada una de varias plantas por introducción reveló que la viabilidad del polen entre las plantas, incluso dentro de las introducciones, era variable, y que los valores individuales de las plantas son más significativos que los valores promedio por introducción en este tipo de estudios.

3.5.3. Comportamiento meiótico

En la meiosis normal de plantas Dicotiledóneas, la primera división meiótica es seguida por una segunda división meiótica en la que los husos en Anafase II están orientados formando un ángulo de 60°; luego, se produce la formación simultánea de surcos de fragmentación que dan como resultado cuatro células de igual tamaño, con el número cromosómico del gametofito (n), y que están contenidas en el meiocito en una disposición tetraédrica final (estadio de tétrada) (Singh, 2003).

La variabilidad observada en el tamaño y viabilidad de los granos de polen, en el presente trabajo, podría explicarse a partir de las anomalías meióticas detectadas en las plantas de todas las introducciones. Dichas anomalías fueron de dos tipos: en la sinapsis cromosómica y/o la segregación, y en la orientación de los husos. Con respecto al primer tipo, los cromosomas rezagados y fuera de placa podrían ser resultado de asinapsis o desinapsis (Koduru y Rao, 1981) y/o segregación cromosómica irregular, mientras que la presencia de un puente cromosómico en Anafase I podría tomarse como una indicación de *crossing-over* dentro de un bucle en una inversión heterocigótica, que podría haber llevado a duplicaciones y/o eliminaciones de regiones cromosómicas en el microsporo (Singh, 2003). Ante esta situación, se esperaba que se formaran células con números de cromosomas desiguales y, de hecho, se observaron meiocitos con cuatro células de tamaño desigual en la etapa de tétrada, heterogeneidad en el tamaño del polen en muestras de plantas individuales, y granos de polen inviables.

Por otro lado, las anomalías en la orientación de los husos meióticos en Metafase II pueden conducir a la formación de tétradas lineales o desorganizadas. Sin embargo, si la orientación de los husos es paralela, fusionada o tripolar, se pueden formar díadas en el estadio de tétrada, con ambas células con el número cromosómico del esporofito (las dos primeras orientaciones), o tríadas, con dos células con el número cromosómico del gametofito y una célula con el número de esporofito (Mok y Peloquin, 1975a). Los husos paralelos observados en Metafase II, y los meiocitos en el estadio de tétrada con dos células de igual tamaño y una tercera célula más grande pueden explicar el origen de

los granos de polen $>n$ viables, con diámetros de aproximadamente 1,26 veces mayores que el diámetro de los granos de polen de tamaño más frecuente (n). Esos granos de polen podrían considerarse granos de polen $2n$ (Camadro, 1986; Carputo *et al.*, 2003; Kumar y Singhal, 2011).

Las mutaciones genéticas y las condiciones ambientales pueden explicar la variabilidad encontrada en la viabilidad del polen y la formación de gametos en las plantas superiores (Bretagnolle y Thompson, 1995; Peloquin *et al.*, 1999). La formación hereditaria de gametos $2n$ se ha atribuido a la acción de genes simples recesivos con penetrancia incompleta y expresividad variable (Mok y Peloquin, 1975b, Bretagnolle y Thompson, 1995). En nuestro estudio, las plantas de todas las introducciones se cultivaron en el mismo entorno; por lo tanto, es muy probable que el mecanismo citológico que condujo a la formación de husos paralelos y tripolares esté bajo el mismo control genético, como en otras Dicotiledóneas (ver Carputo *et al.*, 2006).

3.5.4. Distribución geográfica de los poliploides

Crisci *et al.* (2001) sugirieron que la evolución de las Asteraceae en el Sistema serrano de Tandilia se vio afectada por eventos geológicos relacionados con el levantamiento de los Andes y las glaciaciones del Pleistoceno. Los ciclos secos y húmedos causaron la fragmentación y diferenciación de las poblaciones y la vegetación semiárida se extendió en el continente (Simpson, 1975 y Prado y Gibbs, 1993 en Crisci *et al.*, 2001). Dicha fragmentación y diferenciación podrían haber provocado una eventual separación de poblaciones, restringiéndolas a suelos rocosos y sueltos propios de regiones más elevadas (Crisci *et al.*, 2001). Además, Stebbins (1947) propuso que los poliploides podrían tener una mayor capacidad para conquistar nuevos nichos ecológicos que los diploides. En este sentido, Otto y Witton (2000) sugirieron que los cambios en el metabolismo, tasas de desarrollo, regulación genética y/o tolerancias fisiológicas, entre otros factores, podrían alterar las interacciones bióticas y las tolerancias ecológicas, desempeñando papeles críticos en el establecimiento y diversificación de los linajes poliploides recién formados. Por lo tanto, el hecho de que solo los citotipos hexaploides de *Ch. flexuosa* se encontraron en el límite sur de la distribución de esta especie estaría en concordancia con la propuesta de Crisci *et al.* (2001) y sustentaría la hipótesis de Stebbins (1947). Se han observado diferencias morfológicas en el color de las flores, tamaño y número de inflorescencias y hojas entre las plantas de las poblaciones del noreste y sudeste de esta especie creciendo bajo las

mismas condiciones ambientales (Echeverría, obs. pers.). La región sureste de la provincia de Buenos Aires tiene temperaturas e incidencia de precipitaciones significativamente menores que el área central de la distribución de esta especie. Cambios fenotípicos resultantes de eventos de poliploidización en *Ch. flexuosa* podrían haber jugado un papel importante en el establecimiento de nuevos citotipos, y la posterior colonización de los mismos de nuevas áreas geográficas como lo es el sur de la provincia de Buenos Aires. Aunque esta hipótesis podría explicar la presencia de citotipos hexaploides bajo condiciones climáticas más templadas y moderadas que el clima típico de la zona central de distribución de esta especie, no explica por qué los tetraploides solo se han encontrado en el área de distribución norte junto con los diploides. Las intervenciones antrópicas que modificaron los paisajes originales durante el siglo pasado podrían proporcionar una posible explicación. De hecho, las características agroclimáticas de la provincia de Buenos Aires han impulsado el avance de prácticas agronómicas y propiciado la urbanización. Estas intervenciones antrópicas han llevado a la casi completa desaparición de las comunidades vegetales originales de la región y muchas poblaciones naturales de plantas ya no se encuentran en dicha región (Zalba y Villamil *et al.*, 2002), aunque algunas especies nativas, entre ellas *Ch. flexuosa*, todavía pueden prosperar en las sierras del Sistema serrano de Tandilia (Alonso *et al.*, 2009).

El *fitness* o ajuste y la flexibilidad genética de las poblaciones naturales están relacionadas con el modo de reproducción y la estabilidad del medio ambiente. La reproducción asexual de las plantas adaptadas a un entorno determinado proporciona altos niveles de ajuste en condiciones estables, pero baja flexibilidad genética en condiciones inestables, mientras que lo contrario ocurre para la reproducción sexual. Las plantas que tienen ambos tipos de reproducción tendrían más éxito con el tiempo que las que tienen uno u otro tipo. En este sentido, *Ch. flexuosa* combina la reproducción vegetativa a través del xilopodio y la reproducción sexual mediante la alogamia resultante de la protandria (observación personal). Además, la formación de granos de polen $2n$ mediada por el mismo mecanismo citológico observado en todas las introducciones analizadas puede tomarse como una indicación de que el mecanismo es hereditario. Por lo tanto, se puede formular la hipótesis de que la poliploidización sexual fue instrumental en el origen de los citotipos tetraploides y hexaploides. El establecimiento y la posterior expansión geográfica de los citotipos poliploides de *Ch. flexuosa* podrían explicarse por su mayor capacidad para almacenar alelos que sus contrapartes diploides y, por lo tanto, la generación de nuevas interacciones intra e inter

locus que podrían estar expuestas a la selección y que no pueden ocurrir a un nivel de ploidía más bajo (ver Mendiburu y Peloquin, 1976).

3.6. Conclusiones

La citometría de flujo parece ser una técnica confiable para realizar estimaciones de ploidía en poblaciones de *Chrysolea flexuosa* ya que el número cromosómico resultó acorde con el contenido de ADN. Sin embargo, se deben tomar precauciones al aplicar esta técnica ya que se detectaron cambios significativos en el tamaño del genoma monoploide con el aumento de la ploidía.

El gran número de plantas productoras de granos de polen $2n$ vía un mecanismo citológico que se sabe que en otros grupos de plantas está controlado genéticamente, así como las irregularidades observadas en la meiosis son indicios de que la hibridación y la poliploidización sexual podrían haber jugado un papel importante en el origen, establecimiento y expansión de las poblaciones naturales.

Respecto a la distribución de los citotipos poliploides de *Ch. flexuosa* en Argentina:

- (1) en el área comprendida entre el noreste del país y el extremo sur del Sistema serrano de Tandilia, no se han registrado poblaciones naturales de *Ch. flexuosa*, ni hay introducciones en las colecciones de trabajo. Por lo tanto, los viajes de prospección y recolección de esta especie deberían llevarse a cabo en dicha área. Se debería hacer especial hincapié en explorar la zona sur de la provincia de Entre Ríos, que limita con el norte de la provincia de Buenos Aires, para aclarar la distribución de los citotipos poliploides;
- (2) surge la necesidad de realizar estudios citogeográficos, con un número representativo de plantas por población, para arribar a conclusiones sólidas sobre el posible pool génico de dichas plantas.

El desarrollo de estrategias de muestreo y multiplicación *ex situ* serían de suma importancia para la conservación de la diversidad genética natural de esta especie y su uso efectivo en el mejoramiento genético y otros fines aplicados (véase Camadro 2012 para un ejemplo en las papas silvestres).

4. CAPÍTULO III

Diversidad morfológica y molecular de introducciones de *Chrysolaena flexuosa* (Sims) H. Rob. de diferente ploidía: implicancias para su utilización en programas de mejoramiento de especies ornamentales

4.1. Resumen

Chrysolaena flexuosa es una especie nativa de Sudamérica de interés ornamental, por lo que es relevante disponer de información sobre la variabilidad natural de sus poblaciones con miras a la obtención de cultivares comerciales. Sin embargo, no se dispone de dicha información, la que facilitaría el trabajo de los fitomejoradores. Por eso, el objetivo del presente trabajo fue realizar un análisis conjunto de caracteres morfológicos, citogenéticos y moleculares en siete introducciones que cubren el rango de distribución en la Argentina y que poseen ploidías variables según origen geográfico ($2n=2x=20$; $2n=4x=40$; $2n=6x=60$). Para tal fin, se registraron 26 caracteres morfológicos vegetativos y reproductivos en plantas individuales y se realizó la caracterización molecular con marcadores AFLP. Se realizaron análisis multivariados y AMOVA, y se empleó el índice F_{st} para evaluar la diversidad genética de las introducciones. Los genotipos diploides presentaron menor tamaño de los órganos caracterizados que los poliploides. El análisis multivariado conjunto de caracteres morfológicos y ploidía diferenció tres grupos de introducciones según origen geográfico: Buenos Aires; Entre Ríos; y Corrientes y Misiones. El análisis multivariado combinando caracteres morfológicos, citogenéticos y moleculares sustentó la separación de las introducciones en función del origen geográfico, aunque de forma menos clara. En el AMOVA las diferencias entre introducciones según regiones geográficas no resultaron significativas ($p=0,123$), correspondiendo el mayor porcentaje de la varianza molecular a la variación intrapoblacional (88,1%). El índice F_{st} indicó moderada diferenciación genética entre introducciones ($F_{st}=0,11$). A pesar de que algunos caracteres morfológicos resultaron exclusivos de cada introducción (posiblemente por alelos fijados en la población natural de la que provinieron), otros fueron compartidos entre individuos pertenecientes a introducciones originarias de la misma región geográfica. Al tratarse de una especie que exhibe el comportamiento típico de una alógama, se podría especular que, ante compatibilidad sexual, ocurre flujo génico entre poblaciones en función de la distancia. La técnica AFLP resultó apropiada para la detección de variabilidad genética en *Ch. flexuosa*. A su vez, la detección de variabilidad morfológica, citogenética y molecular permitiría la utilización este germoplasma en programas de mejoramiento genético con fines ornamentales.

Palabras clave: AFLP, Lepidaploa, evaluación de germoplasma nativo

Introducción

4.2.1. *Chrysolaena flexuosa* (Sims) H. Rob.

Vernonieae Cass. es la tribu principal de la familia Asteraceae. Incluye más de 1.500 taxones, la mayoría de los cuales crecen de manera espontánea en zonas tropicales del mundo (Jones, 1979; Keeley *et al.*, 2007; Robinson y Skvarla, 2007). Esta tribu ha sido considerada, desde el punto de vista taxonómico, como una de las más complejas dentro de la familia Asteraceae (Keeley *et al.*, 2007). Las discusiones se han centrado principalmente en la delimitación del enorme género básico de la tribu, *Vernonia* Schreber (Bremer, 1994; Robinson, 1999). Este género está integrado por más de 1.000 especies distribuidas en África y Asia en el hemisferio oriental, a lo largo de las Américas en el hemisferio occidental, y en cadenas insulares de ambos hemisferios (Jones, 1979, Keeley *et al.*, 2007). Isawumi (1996) citado en Herman y Swelankomo (2011) propuso que *Vernonia* es un género parafilético, con dos centros principales de origen: Sudamérica y África por un lado, y Asia sudoriental, por otro. Basándose en las características morfológicas de las plantas, el tipo de polen y la composición química, Robinson (1987a, b, 1988a, b) redujo el número de especies de *Vernonia* creando nuevos géneros. Debido a esto, se considera que todas las especies de *Vernonia* son aquellas que crecen en el continente americano, la gran mayoría en América del Norte.

Chrysolaena H. Rob. es uno de los géneros creados en la reclasificación de las especies que integraban el género *Vernonia* y ha sido asignado al complejo *Lepidaploa* (Robinson, 1988b, Dematteis, 2007, 2009). *Chrysolaena* contiene dieciocho especies distribuidas en América del Sur, principalmente desde el centro y sur de Brasil hasta Bolivia y el noreste de la Argentina (Robinson 1988b; Dematteis, 2014). En este último país en particular, se han descrito un total de siete especies (Dematteis, 2014).

Chrysolaena flexuosa (Sims) H. Rob. (= *Vernonia flexuosa* Sims) se distribuye desde el sur de Brasil hasta el sureste de la Argentina, presentando así la distribución más austral para las especies de la Tribu Vernonieae (Cabrerá, 1963; Dematteis, 2014). Para esta especie se han registrado citotipos diploides ($2n=2x=20$) y tetraploides ($2n=4x=40$) para Uruguay, Paraguay, Brasil y noreste de la Argentina (Dematteis, 2009; Vía do Pico y Dematteis, 2012, 2013), y hexaploides ($2n=6x=60$) para el centro-este de la Argentina, específicamente en áreas serranas del sudeste la provincia de Buenos Aires (Hunziker *et al.*, 1990; Echeverría y Camadro, 2017). Se trata de una hierba silvestre, perenne, que ha sido señalada como potencial especie ornamental porque presenta una atípica inflorescencia compuesta, en la que los capítulos, formados por flores cuya paleta de

colores varía del blanco puro al púrpura, se ubican sobre ramas o circinos bajo un patrón de ramificación en zig-zag (Cabrera, 1963; Echeverría y Alonso, 2012; Dematteis, 2014).

4.2.2. Marcadores moleculares de tipo AFLP

Los marcadores genéticos son herramientas clave en las Ciencias Biológicas. Entre los marcadores genéticos se encuentran los caracteres morfológicos, los marcadores proteicos o bioquímicos (como las proteínas de reserva e isoenzimas) y los marcadores moleculares. Cuando los marcadores son invariables en todos los organismos estudiados de una especie o población dada, se los denomina monomórficos. Cuando, en cambio, permiten detectar diferencias entre dichos organismos se los denomina polimórficos (Nuez Viñals y Carrillo Becerril, 2000; Picca *et al.*, 2004; Henry, 2013). La tecnología de los marcadores moleculares ha evolucionado a través del tiempo, de modo que este tipo de marcador genético -que ha ido reemplazando paulatinamente a aquellos métodos que no se basan en el ADN o ARN- son de gran utilidad en la identificación de plantas y en la determinación de relaciones entre éstas. Debido a esto, los programas modernos de mejoramiento genético en plantas han incorporado las herramientas moleculares para aumentar la eficiencia de los procesos en la obtención de cultivares (Henry, 2013).

Los marcadores moleculares representan un punto o porción de referencia en el genoma. Con los datos que se obtienen a partir del uso de los marcadores moleculares basados en el ADN y de fórmulas apropiadas, se pueden estimar distintos parámetros genéticos, conocer la estructura genética de las poblaciones, diferenciar individuos, discriminar entre clones, así como realizar análisis filogenéticos y taxonómicos, entre otros objetivos (Nuez Viñals y Carrillo Becerril, 2000).

Entre los marcadores moleculares de ADN que se han empleado con éxito en distintas especies vegetales se encuentran los AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* o polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados). Los AFLP son marcadores dominantes, es decir, con ellos no es posible discriminar entre heterocigotas y homocigotas para un mismo locus génico. A pesar de esa desventaja, son marcadores multi-locus que permiten analizar al azar regiones de ADN distribuidas en todo el genoma sin tener conocimiento previo de éste, y son altamente reproducibles e informativos ya que producen un gran número de bandas polimórficas (Voss *et al.*, 1995; Nuez Viñals y Carrillo Becerril, 2000; Picca *et al.*, 2004). Debido a estas

características son apropiados para iniciar análisis genéticos en especies que no han sido estudiadas previamente a nivel molecular (Nuez Viñals y Carrillo Becerril, 2000).

Los AFLP se basan en la amplificación selectiva de fragmentos de ADN. En esta técnica se produce la digestión parcial del ADN genómico utilizando enzimas de restricción. A los fragmentos se les unen en cada extremo adaptadores complementarios y luego se amplifican por la reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*). Posteriormente, los productos son separados por tamaño utilizando electroforesis capilar o geles de poliacrilamida. La técnica de AFLP permite detectar cambios de tamaño de las distintas regiones o loci en el genoma y no requiere conocer la secuencia de éste (Voss *et al.*, 1995; Nuez Viñals y Carrillo Becerril, 2000; Picca *et al.*, 2004).

4.2.3. Mejoramiento Genético

En el mejoramiento genético vegetal, la detección de variabilidad genética es un requisito para la selección, domesticación, incorporación y uso de germoplasma. En particular en Floricultura, el conocimiento detallado de los atributos o caracteres de valor ornamental de la especie de interés facilita el desarrollo de estrategias de selección y posterior obtención de cultivares comerciales.

En muchas especies se ha comprobado que los citotipos poliploides presentan mayor tamaño de algunos órganos (Otto y Whitton, 2000). Por eso, el uso de poliploides, tanto naturales como inducidos, es una práctica frecuente en Floricultura, que data de hace varias décadas (Emsweller y Ruttle, 1941; Väinölä, 2000; Van Tuyl y Lim, 2003; Zlesak *et al.*, 2005). Sin embargo, en la actualidad, el mercado floricultor también valora los cultivares comerciales que exhiben bajo porte y/o órganos pequeños, como es el caso del lapacho "Sorpresa INTA" (*Handroanthus heptaphyllus*), la *Poa iridifolia* "Serranita azul INTA-FCA", y la variedad de mercadonia "Poty Amarilla INTA", entre otros (INTA, 2018). Por lo tanto, también resultan valiosos aquellos recursos fitogenéticos que se caracterizan por presentar órganos vegetales pequeños, como frecuentemente se encuentran en individuos diploides de distintas especies (Gulia *et al.*, 2009; Podwyszyńska *et al.*, 2014).

Las poblaciones de *Ch. flexuosa* presentan individuos de distintas ploidías las que podrían vincularse a diferencias significativas en el tamaño de los órganos de interés ornamental. El conocimiento de la variabilidad fenotípica y genética permitiría a los fitomejoradores disponer de germoplasma diverso según los intereses del mercado floricultor, facilitándoles el trabajo y reduciendo, en consecuencia, los costos operativos.

Por eso, el objetivo del presente trabajo fue realizar un análisis conjunto de caracteres morfológicos, citogenéticos y moleculares (utilizando marcadores AFLP) en poblaciones de *Ch. flexuosa* de la Argentina, siendo el primero de este tipo a realizarse en una especie del complejo *Lepidaploa*.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Material vegetal

Se utilizaron siete introducciones (muestras de poblaciones conservadas *ex situ*) de *Chrysoleaena flexuosa* (Tabla 4.1) con distintos niveles de ploidía. Las introducciones de las provincias de Misiones, Corrientes y Entre Ríos (Figura 1) fueron proporcionadas por el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), Argentina. Las de la provincia de Buenos Aires (Figura 2.1) fueron recolectados para este estudio y depositados en la Unidad Integrada Balcarce: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - Facultad de Ciencias Agrarias (UIB); Ruta Nacional 226 Km 73,5, Partido de Balcarce, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Las introducciones cubren el rango de distribución de la especie en Argentina, caracterizado por diferentes regímenes de temperatura y lluvia (Figura 3.2.). Los ejemplares de referencia se depositan en el herbario de la Unidad Integrada Balcarce (BAL).

Tabla 4.1. Origen geográfico de siete introducciones de *Chrysoleaena flexuosa* de la Argentina, ploidía e información sobre los ejemplares de referencia depositados en el Herbario BAL.

Introducción	Localidad	Coordenadas geográficas	Ploidía	Voucher y Nº de colección del herbario BAL
AloEch 1	Provincia de Buenos Aires, partido de Gral. Pueyrredón, Sierra de Los Padres	37° 34' 16" S; 57° 28' 04" O	6x	Echeverría, M.L. 301; BAL No.: 8615
AloEch 2	Provincia de Buenos Aires, partido de Balcarce, Sierra La Barrosa	37° 53' 40" S; 58° 16' 14" O	6x	Echeverría, M.L. 302; BAL No.: 8616
AloEch 3	Provincia de Buenos Aires, partido de Balcarce, Sierra La Chata	37° 52' 13" S; 58° 22' 40" O	6x	Echeverría, M.L. 303; BAL No.: 8617
Nu 1	Provincia de Buenos Aires, partido de Balcarce, Sierra La Bachicha	37° 47' 52" S; 58° 08' 36" O	6x	Echeverría, M.L. 304; BAL No.: 8618
VdPDFV 26	Provincia de Misiones, Dpto. Capital	27° 26' 47" S; 55° 54' 11" O	2x	Echeverría, M.L. 305; BAL No.: 8619
VdPDFV 45	Provincia de Corrientes, Dpto. Itá Ibaté	27° 26' 47" S; 57° 20' 01" O	2x	Echeverría, M.L. 306; BAL No.: 8620
VdPDFV 14	Provincia de Entre Ríos, Dpto. Federación	30° 42' 12" S; 58° 00' 40" O	4x	Echeverría, M.L. 307; BAL No.: 8621

Ref.: Coleccionistas de las introducciones: Alo = Alonso, S.I.; Ech = Echeverría, M.L.; Nu = Nuciari, M.C.; VdP = Via do Pico, G.; D = Dematteis, M.; F = Farco, G.; V = Vega, A.

Las plantas fueron obtenidas a partir de semillas en cajas de Petri, mediante el sistema *top paper*, en cámara de germinación, y cuando presentaron raíz seminal y cotiledones visibles se trasplantaron en bandejas plantineras con sustrato a base de suelo esterilizado, turba y perlita (3:1:1, v/v/v) en invernáculo. Posteriormente, cuando las plántulas presentaron al menos tres hojas verdaderas, se trasplantaron en macetas individuales de 3 l empleando el mismo sustrato. Durante la primavera, las plantas en maceta se colocaron al aire libre (Figura 2.2) en una parcela en la UIB (37° 45' S, 58° 18' O; 130 msnm).

4.3.2. Caracterización morfológica

En plantas individuales se registraron a campo caracteres morfológicos vegetativos y reproductivos de interés ornamental, en dos ciclos de crecimiento: ciclos 2012/13 y 2013/14 -ciclos 1 y 2, respectivamente- (Tabla 4.2). Las mediciones se realizaron en dos estadios fenológicos: *estadio 1* – plena floración, *estadio 2* – fin de fructificación. En total se registraron 23 caracteres cuantitativos y tres caracteres cualitativos (Figuras 4.1 y 4.2). Los registros realizados en el *estadio 2* así como los de los caracteres cualitativos se realizaron en un solo ciclo de crecimiento.

Tabla 4.2. Caracteres morfológicos evaluados en introducciones de *Chrysolea flexuosa* de la Argentina, incluyendo estadio fenológico en el momento de medición, denominación, abreviatura y unidades/escalas utilizadas.

Estadio	Carácter morfológico	Abreviatura		Unidades/escalas
		Ciclo 1	Ciclo 2	
1	Hojas	NH1	NH2	número
1	Longitud de la hoja más larga	LH1	LH2	cm
1	Ancho de la hoja más larga	AH1	AH2	cm
1	Altura de la vara hasta la base del capítulo principal	AV1	AV2	cm
1	Varas	NV1	NV2	número
1	Ramas o circinos	NR1	NR2	número
1	Capítulos/vara	NC1	NC1	número
1	Diámetro del capítulo principal	DC1	DC1	cm
1	Altura del capítulo principal	AC1	AC1	cm
1	Promedio de la longitud de tres corolas	LC1	LC2	mm
1	Color de los filarios		-	verde; violáceo
1	Color de las corolas		-	púrpura; lila; rosado; blanco
1	Pubescencia de las hojas		-	pubescente; pelos ralos
2	Hojas en otoño		NHF	número
2	Longitud de la hoja más larga		LHF	cm
2	Ancho de la hoja más larga		AHF	cm



Figura 4.1. Ejemplar adulto de *Chrysolea flexuosa* en pre-anteses con indicación de algunos caracteres morfológicos cuantitativos registrados en siete introducciones silvestres de la Argentina. a: capítulo en plena floración; b: corola.

Ref.: AV: altura de la primera vara floral; DC: diámetro del capítulo principal en plena floración; AC: altura del capítulo principal en plena floración; LC: longitud de la corola. Las flechas señalan los circinos o ramas florales.



Figura 4.2. Caracteres cualitativos registrados en siete introducciones silvestres de *Chrysolea flexuosa* de la Argentina. a: corolas blancas; b: corolas rosadas; c: corolas lilas; d: corolas púrpuras; e: hojas con pelos ralos; f: hojas pubescentes; g: filarios verdes; h: filarios violáceos.

4.3.3. Caracterización molecular

Se almacenaron hojas jóvenes de plantas individuales en *freezer* a -20° C. A partir de hojas se extrajo ADN genómico de las muestras siguiendo el método de CTAB (Haymes, 1996) con mínimas modificaciones ya que se emplearon aproximadamente 20 mg de tejido foliar. A su vez, a cada extracción se le agregó 2 μ l de ARNasa, dejando reposar las muestras a temperatura ambiente durante 2 h. La determinación de la integridad del ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7% utilizando SYBR Safe® (Invitrogen) para la tinción y visualizando los geles, bajo transiluminador de luz azul Safe Imager™ 2.0 (Invitrogen, Life Technologies). La cuantificación y la calidad del ADN se midieron con espectrofotómetro (BIO-RAD SmartSpect TM 3000).

El protocolo de AFLP se realizó de acuerdo a Vos *et al.* (1995) con ligeras modificaciones. En un total de 1000 ng de ADN genómico por muestra se realizó una doble digestión del ADN total con las enzimas de restricción *EcoRI* (Promega) y *MseI* (NEB) en termociclador (Veriti) a 37° C durante 3 h. La mezcla de reacción de la digestión (volumen final 12,5 μ l) contenía 12,35 μ l de H₂O ultra pura, 1,25 μ l de buffer de restricción (NEB), 0,125 μ l de BSA (Promega), 0,2 μ l de *MseI* (2U) y 0,1 μ l *EcoRI* (1U). El resultado de la digestión fue verificado mediante electroforesis en gel de

agarosa al 1% en forma similar a lo realizado para cuantificar el ADN genómico. Se consideró una restricción exitosa al resultado de un chorreado (*smear*) de ADN comprendido en un rango de tamaño de 100 a 1200 pares de bases (pb). Se ligaron los adaptadores específicos *EcoRI* (5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3' y 5'-AAT TGG TAC GCA GTC TAC-3') y *MseI* (5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3' y 5'-TAC TCA GGA CTC AT-3') a los sitios de corte de cada fragmento incubando las muestras por 3 h a 20 °C. La mezcla de ligación (volumen final 12,5 µl) contenía 2,75µl de H₂O ultra pura, 1,25 µl de buffer de ligamiento T4 10X (Promega), 1 µl (50 pmol/µl) de adaptador *MseI* y 1 µl (5 pmol/µl) de adaptador *EcoRI* y 0,25 µl (3 U/µl) de enzima T4 ligasa (Promega).

Se realizó una amplificación preselectiva (PCR +1) utilizando cebadores con un nucleótido selectivo adicional (*EcoRI* + A / *MseI* + C), siguiendo un programa de 20 ciclos a 94° C por 30 s, 56° C por 60 s, y 72° C por 60 s en un termociclador Veriti. La mezcla de reacción para la amplificación preselectiva contenía 1 µl del producto de la ligación, 17 µl de H₂O ultra pura, 5 µl de buffer Green 5X para PCR (Promega), 1 µl de dNTP NEB (10 mM), 0,4 µl de *EcoRI* + A (100 ng/µl) y 0,4 µl de *MseI* + C (100 ng/µl) y 0,2 µL de GoTaq (5 U/µL) (Promega). El resultado de la amplificación preselectiva fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se consideró una reacción de PCR exitosa al resultado de un chorreado de ADN comprendido en un rango de tamaño de 100 a 750 pb. Los productos de PCR se diluyeron en *buffer* TE 1 M (Tris/HCl, 10 mM pH = 8.0 y EDTA, 1 mM). La amplificación selectiva se realizó con dos combinaciones de cebadores + tres cebadores seleccionados por haber sido usados con éxito en otras especies de la familia Asteraceae, pertenecientes a Tribus cercanas a Vernoniae: *Helianthus annuus* L. (Heliantheae), *Cichorium intybus* L., *C. endivia* L., y *Lactuca sativa* L. (Cichorieae) (Kiers, 2000). Las combinaciones de cebadores empleadas fueron *EcoRI*-ACA / *MseI*-CAG y *EcoRI*-ACA / *MseI*-CTC. El extremo 5' del iniciador *EcoRI*-ACA se marcó con fosforamidita ("HEX"). La mezcla de reacción para la amplificación selectiva contenía 12,95 µl de H₂O ultra pura, 4 µl de buffer Green 5X para PCR (Promega), 0,4 µl de dNTP NEB (10 mM), 0,25 µl de *EcoRI* + ACA "HEX" (100 ng/µl) y 0,3 µl de *MseI* + 3 (CAG o CTC) (100 ng/µl) y 0,1 µL de GoTaq (5 U/µL) (Promega). Las condiciones de la PCR fueron: un ciclo a 94° C por 30 s, 65° C por 30 s, y 72° C por 60 s; luego la temperatura de ensamblado se bajó 0,7° C por cada uno de 12 ciclos, que fueron seguidos por 23 ciclos a 94° C por 30 s, 56° C por 30 s y 72° C por 60 s. Se realizaron réplicas de 8% de las muestras. El resultado de la amplificación selectiva fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% considerando

como reacción de PCR exitosa a la obtención de chorreado de ADN comprendido en un rango de tamaño de 100 a 500 pb.

Los productos de la amplificación se separaron en un secuenciador automático (Applied Biosystems 3500xl / Genetic Analyzer) con un estándar interno (GeneScan 500 (-250) Rox), en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología del INTA (Castelar, Argentina). El perfil de AFLP obtenido para cada muestra se visualizó con el programa de libre acceso PEAKSCANNER[®] (Applied Biosystems), disponible en <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/4381867>. La información generada por este *software* se utilizó como conjunto de datos de entrada para el programa RawGeno v2.0-1 (Arrigo et al., 2009, disponible en <http://sourceforge.net/projects/rawgeno/>), que funciona sobre el entorno R (Team R, 2012). Empleando este programa los datos de pico por individuo se codificaron de manera semiautomática en matrices alélicas binarias de presencia y ausencia de cada carácter, seleccionándose los picos con una intensidad de fluorescencia mayor a 100 RFU (unidades relativas de fluorescencia) y con tamaños de entre 50 y 500 pb. Los picos no reproducibles fueron eliminados. A su vez, de la tabla de salida binaria se eliminaron automáticamente los marcadores monomórficos. Al igual que en el trabajo de Smith *et al.* (2015), se excluyeron aquellos fragmentos que no estaban presentes en al menos dos individuos.

4.3.4. Análisis de datos

Se estudiaron las relaciones de similitud entre aquellos individuos que exhibieron resultados satisfactorios en la lectura de los picos. Para esto se realizaron análisis de ordenación y de agrupamiento construyendo matrices de similitud para todos los pares de individuos. Las matrices de distancia se obtuvieron a partir de las correspondientes matrices de similitud mediante la transformación de cada valor de similitud en uno de distancia (Cuadras, 2014) y se utilizaron para realizar tres caracterizaciones a partir de Análisis de Coordenadas Principales (A.Coo.P.). Una de las caracterizaciones contempló los registros moleculares y se empleó el coeficiente de similitud de Jaccard para elaborar la matriz de distancia (Cuadras, 2014). Las restantes consistieron en la realización de caracterizaciones conjuntas considerando, por un lado, la ploidía y los registros morfológicos y, por otro, la ploidía, los registros morfológicos y los moleculares. Para las caracterizaciones conjuntas se concatenaron las distintas matrices y se empleó el coeficiente de similitud de Gower (Gower, 1971; Cuadras 2014) ya que permite

emplear variables mixtas, cuali y cuantitativas y contemplar situaciones de valores faltantes.

Con la información de los AFLP se realizó además un análisis de agrupamiento por individuo, mediante análisis de *cluster* jerárquico, empleando el criterio de encadenamiento de la media (UPGMA) sobre la matriz de distancias (Cuadras, 2014). Las relaciones entre individuos se visualizaron a partir de un dendrograma cuya matriz cofenética se correlacionó con la matriz de distancia a fin de obtener el valor del coeficiente de correlación cofenético. A su vez, a partir de los caracteres morfológicos cualitativos y la ploidía se realizó un Análisis Factorial de Correspondencia Simple para las introducciones. Todos los análisis se realizaron usando el programa R (Team R, 2012).

Para analizar la partición de la varianza genética se realizó un Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA) con una estructura jerárquica: origen geográfico, introducción dentro de origen geográfico e individuo dentro de introducción (Excoffier *et al.*, 1992). Para testear la significancia de los componentes de la varianza se empleó una aproximación no paramétrica con 1023 permutaciones. Para evaluar la diversidad genética de las poblaciones se estimó el índice de Fijación de Wright (F_{st}). Estos análisis se llevaron a cabo usando el programa Arlequín 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

4.4. Resultados

4.4.1. Caracterización morfológica

Los caracteres morfológicos cuantitativos más dispersos fueron número de capítulos por vara floral, en el ciclo de crecimiento 1, y número de varas por planta, en el ciclo 2, con CV de 44 y 40%, respectivamente. Los caracteres asociados a número de hojas, longitud foliar y número de capítulos presentaron correlación alta y positiva entre ellas. A su vez, estas variables presentaron correlación alta, pero negativa, con aquellos caracteres asociados a ancho foliar, longitud de corola, diámetro y altura del capítulo central (Figura 4.3). La información registrada en base a estos caracteres evidenció que los individuos hexaploides de las introducciones provenientes de Buenos Aires (AloEch 1, AloEch 2, AloEch 3, Nu1) y los tetraploides de Entre Ríos (VdPDFV 14), a diferencia de los diploides de Corrientes y Misiones (VdPDFV 45, VdPDFV 26), presentaron menor número de hojas, de varas florales y de capítulos por vara floral. A su vez, las hojas de las introducciones provenientes de Buenos Aires y de Entre Ríos fueron más anchas y

ligeramente más largas, los capítulos más grandes y las corolas más largas que las de Corrientes y Misiones (Tabla 4.3, Figura 2.12 y 2.14).

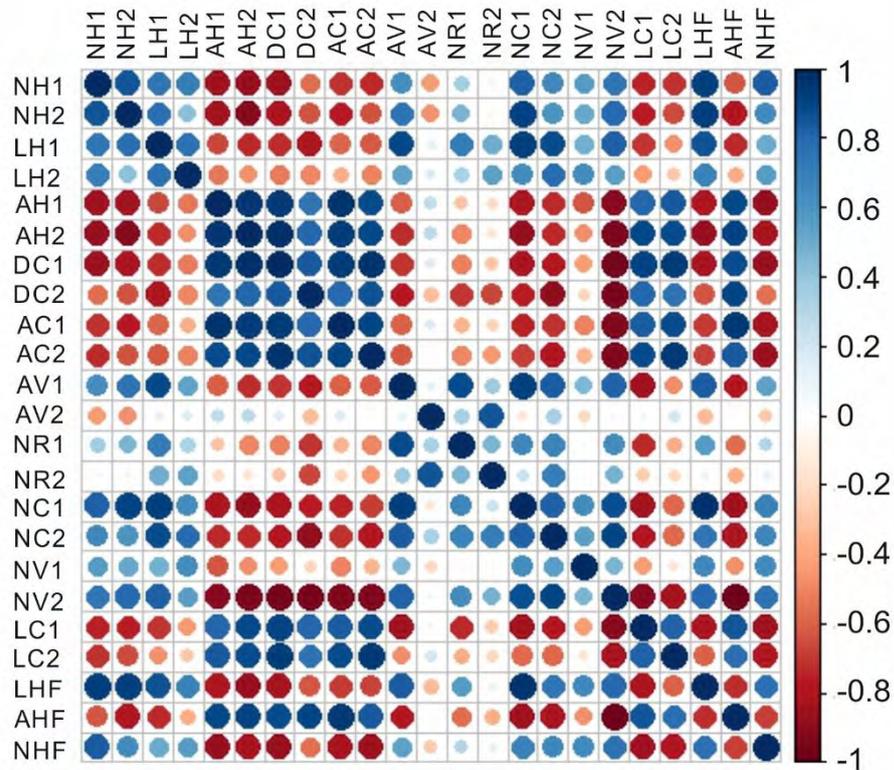


Figura 4.3. Correlación entre 23 caracteres morfológicos registrados en siete introducciones de *Chrysolaena flexuosa* de la Argentina. Colores fríos señalan correlaciones positivas, colores cálidos señalan correlaciones negativas, ausencia de color señala ausencia de correlación. La correlación aumenta con el diámetro de los círculos y la intensidad del color.

Ref.: número de hojas ciclo 1 y 2 (NH1 y NH2), longitud de la hoja más larga ciclo 1 y 2 (LH1 y LH2), ancho de la hoja más larga ciclo 1 y 2 (AH1 y AH2), diámetro del capítulo principal ciclo 1 y 2 (DC1 y DC2), altura del capítulo principal ciclo 1 y 2 (AC1 y AC2), número de varas ciclo 1 y 2 (NV1 y NV2); número de ramas ciclo 1 y 2 (NR1 y NR2); número de capítulos ciclo 1 y 2 (NC1 y NC2); número de varas ciclo 1 y 2 (NV1 y NV2), longitud promedio de tres corolas ciclo 1 y 2 (LC1 y LC2), longitud de la hoja más larga en fructificación (LHF), ancho de la hoja más larga en fructificación (AHF), número de hojas en fructificación (NHF).

Tabla 4.3. Valores medios y coeficientes de variación (CV) de 26 caracteres morfológicos registrados en siete introducciones de *Chrysolea flexuosa* de la Argentina.

CARACTERES MORFOLÓGICOS	INTRODUCCIONES													
	AloEch 1		Nu 1		AloEch 2		AloEch 3		VdPDFV 14		VdPDFV 45		VdPDFV 26	
	Media	CV (%)	Media	CV (%)	Media	CV (%)	Media	CV (%)	Media	CV (%)	Media	CV (%)	Media	CV (%)
CUANTITATIVOS														
NH1	12,3	16,7	15,8	32,7	21,8	45,8	20,8	54,9	24,7	41,3	31,2	38,1	26,3	22,4
NH2	42,1	50,0	45,5	33,6	56,6	13,4	67,9	26,5	49,9	32,0	88,2	24,1	74,1	27,5
LH1	9,5	13,7	8,0	24,1	11,0	13,4	8,5	21,9	9,0	18,0	13,5	19,0	12,0	18,2
LH2	9,4	20,9	9,6	10,8	10,7	11,2	8,6	25,3	10,6	23,1	11,5	13,2	10,2	27,5
AH1	3,1	17,7	2,2	16,1	2,6	21,1	2,4	23,0	2,3	22,7	1,3	32,1	1,5	28,4
AH2	2,2	17,7	1,9	36,6	1,9	46,0	1,6	49,2	1,7	41,4	0,9	24,7	0,9	30,2
DC1	2,7	10,2	2,4	16,3	2,5	19,9	2,4	32,7	2,2	11,3	1,7	16,5	1,5	18,2
DC2	2,5	14,7	2,6	22,4	2,5	24,4	2,7	20,1	2,6	17,7	2,2	14,6	2,0	31,4
AC1	2,5	4,1	2,0	3,5	2,5	2,8	2,2	15,4	2,2	10,1	1,6	14,5	1,5	12,5
AC2	2,5	3,1	2,2	17,4	2,4	7,6	2,4	9,7	2,0	14,6	1,9	19,8	1,6	25,9
AV1	20,2	20,9	14,6	27,8	17,7	36,4	17,3	36,5	17,2	28,4	25,3	14,1	22,9	22,2
AV2	31,0	23,8	27,0	60,6	26,7	27,7	18,9	34,2	24,6	31,4	23,8	23,2	28,1	35,3
NR1	2,8	26,6	1,8	59,1	2,3	41,2	2,2	35,9	2,3	21,0	2,8	35,0	3,0	35,6
NR2	3,0	54,4	2,9	65,6	3,0	47,1	2,0	59,8	2,7	17,1	2,9	33,2	3,3	45,5
NC1	5,3	71,8	4,0	55,1	6,1	49,8	6,0	50,9	5,4	25,0	12,9	41,5	9,5	56,5
NC2	8,3	35,3	7,6	74,2	8,4	36,1	4,5	47,5	8,4	37,9	13,6	55,3	12,7	40,3
NV1	1,0	0,0	1,1	31,4	1,0	0,0	1,0	0,0	1,1	28,7	1,4	62,0	1,0	0,0
NV2	1,7	28,5	2,0	46,3	1,9	44,5	1,8	79,4	2,0	44,7	3,7	32,4	4,0	47,9
LC1	11,9	15,8	13,2	18,2	13,5	19,1	11,7	16,1	10,7	19,1	8,1	11,4	7,7	12,3
LC2	14,9	13,3	13,0	12,4	13,8	17,1	12,5	10,7	11,9	22,1	11,5	17,3	8,8	11,5
LHF	6,7	32,5	6,2	32,6	7,9	32,3	8,0	14,1	8,2	22,0	11,7	27,6	9,4	27,3
AHF	2,4	36,8	2,2	19,2	2,6	36,3	2,3	25,4	2,6	30,8	1,4	38,5	1,3	29,0
NHF	11,1	50,1	15,8	31,8	11,4	54,4	15,3	54,1	22,8	50,8	25,1	52,7	22,4	44,1
CUALITATIVOS														
Pubescencia de hojas	pubescente		pubescente		pubescente		pubescente		pubescente		pelos raros		pelos raros	
Color de filarios	violáceos		violáceos		violáceos		violáceos		verdes		verdes		Verdes	
Color de corolas	púrpuras		púrpuras		púrpuras		púrpuras		blancas		lilas; rosadas; blancas		blancas; rosadas	

Ref.: Provincia de Buenos Aires: AloEch 1, AloEch 2, AloEch 3, Nu 1; Provincia de Entre Ríos: VdPDFV 14; Provincia de Corrientes: VdPDFV 45; Provincia de Misiones: VdPDFV 26.

Abreviaturas: número de hojas ciclo 1 y 2 (NH1 y NH2), longitud de la hoja más larga ciclo 1 y 2 (LH1 y LH2), ancho de la hoja más larga ciclo 1 y 2 (AH1 y AH2), diámetro del capítulo principal ciclo 1 y 2 (DC1 y DC2), altura del capítulo principal ciclo 1 y 2 (AC1 y AC2), número de varas ciclo 1 y 2 (NV1 y NV2); número de ramas ciclo 1 y 2 (NR1 y NR2); número de capítulos ciclo 1 y 2 (NC1 y NC2); número de varas ciclo 1 y 2 (NV1 y NV2), longitud promedio de tres corolas ciclo 1 y 2 (LC1 y LC2), longitud de la hoja más larga en fructificación (LHF), ancho de la hoja más larga en fructificación (AHF), número de hojas en fructificación (NHF).

Los registros poblacionales de los caracteres morfológicos cualitativos se combinaron con los registros citogenéticos para realizar un Análisis Factorial de Correspondencia Simple, en el que se distinguieron tres grupos. Un grupo estuvo integrado por las introducciones de Buenos Aires, otro por la introducción de Entre Ríos y otro por las introducciones de Corrientes y Misiones. Los dos primeros componentes explicaron un porcentaje de la variabilidad total superior al 70 % (Figura 4.4). Las introducciones provenientes de la Provincia de Buenos Aires se asociaron a los caracteres hojas pubescentes, filarios violáceos y corolas púrpuras, la introducción de Entre Ríos a hojas pubescentes, filarios verdes y corolas blancas y las introducciones de Corrientes y Misiones a hojas con pelos ralos, filarios verdes y corolas de color lila y rosado.

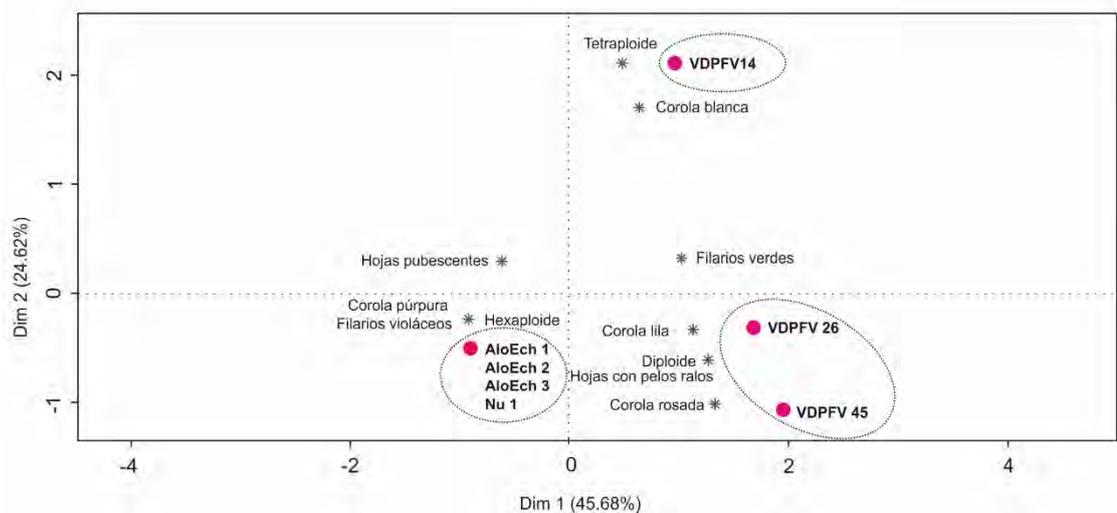


Figura 4.4. Análisis Factorial de Correspondencia Simple de siete introducciones de *Chrysolea flexuosa* de la Argentina, en base a cuatro caracteres morfológicos cualitativos: pubescencia del follaje, color de los filarios, color de la corola y nivel de ploidía.

El Análisis de Coordenadas Principales en base a datos combinados de ploidía y los 26 caracteres morfológicos registrados se realizó sobre los individuos de las siete introducciones (Figura 4.5). Este análisis agrupó las introducciones de forma similar que el análisis factorial de correspondencia. Los tres primeros autovalores explicaron un porcentaje de la variabilidad total igual a 50,0, 16,0 y 9,6%, respectivamente.

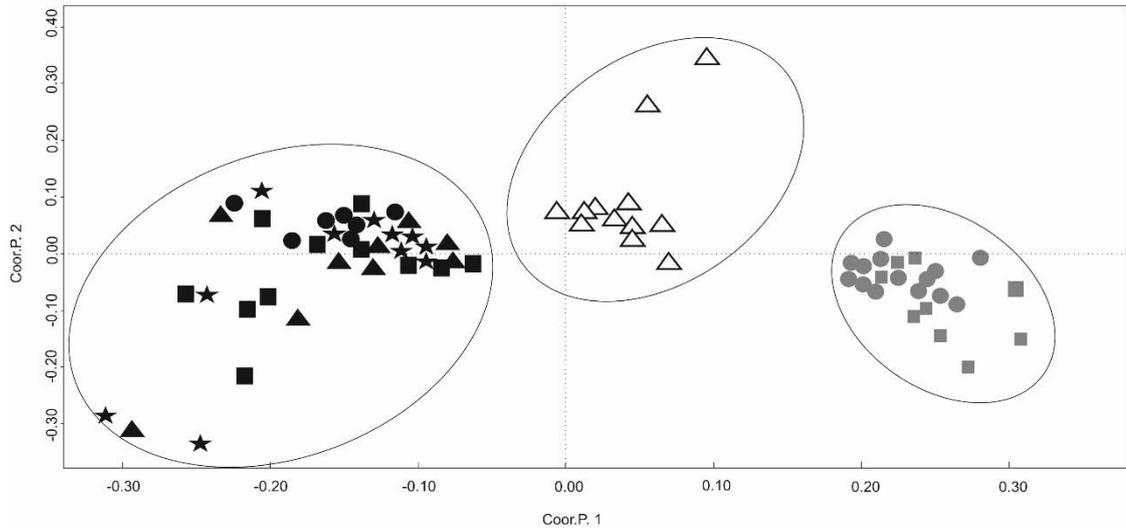


Figura 4.5. Análisis de Coordenadas Principales sobre matriz de similitud general de Gower, en base a datos combinados de ploidía y 26 caracteres morfológicos. Representación de 73 individuos pertenecientes a siete introducciones de *Chrysolea flexuosa* de la Argentina sobre dos primeras coordenadas principales.

Ref.: ■: VdPDFV 26; ●: VdPDFV 45; △: VdPDFV 14; ●: AloEch 1; ★: AloEch 2; ■: AloEch 3; ▲: Nu 1.

Nota: aporte de las tres primeras coordenadas: 50,02; 15,95; 9,61 %, respectivamente.

4.4.2. Caracterización molecular

4.4.2.1. Productos de amplificación de AFLP

Las dos combinaciones de cebadores de AFLP seleccionadas permitieron generar información para describir 73 individuos de las siete introducciones. En total se detectaron 256 bandas polimórficas. La combinación de cebadores que resultó más informativa fue *EcoRI-ACA/MseI-CAG*, ya que permitió detectar un mayor número de bandas polimórficas: 151 bandas contra 105 de la combinación *EcoRI-ACA / MseI-CTC*. Los fragmentos obtenidos presentaron longitud variable de entre 54 y 470 pb.

4.4.2.2. Análisis molecular de la varianza (AMOVA)

Se realizó un AMOVA para analizar la partición de la varianza genética de acuerdo a las agrupaciones resultantes del A.Coord.P. realizado en base a datos combinados de ploidía y caracteres morfológicos. Por lo tanto, la comparación se realizó entre tres

grupos: introducciones de la Provincia de Buenos Aires, introducción de la Provincia de Entre Ríos e introducciones de las Provincias de Corrientes y Misiones.

El AMOVA reveló que las diferencias en la varianza molecular entre regiones de origen no fueron significativas (Tabla 4.4). De la varianza molecular total, el mayor porcentaje (88,1%) correspondió a la variación dentro de las introducciones, es decir, entre individuos pertenecientes a una misma introducción, resultando dicha variación estadísticamente significativa ($p < 0,00001$). El menor porcentaje de variación (1,5%) correspondió a la variación entre introducciones recolectadas en un mismo origen geográfico -provincia de Buenos Aires, por un lado, y provincias de Corrientes y Misiones, por otro-, sin presentar diferencias estadísticamente significativas. Por su parte, el índice de Fijación de Wright (F_{st}) fue de 0,11, indicando moderada diferenciación entre introducciones.

Tabla 4.4. AMOVA basado en datos de marcadores AFLP de siete introducciones de *Chrysolaela flexuosa* de la Argentina.

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componente de la varianza	% de variación	<i>P</i>
Entre origen geográfico	2	232,548	3,61740	10,4	0,123
Entre introducciones dentro de origen geográfico	4	143,232	0,52179	1,5	0,126
Entre individuos dentro de introducciones	66	2026,11	30,8378	88,1	0,0000

4.4.2.3. Afinidad entre las poblaciones en base a los caracteres moleculares

4.4.2.3.1. Análisis de agrupamiento

El análisis de agrupamiento, construido con la información de cada individuo, en base a la matriz de distancia calculada con el coeficiente de Jaccard, presentó un coeficiente de correlación cofenético de 0,75. Por lo tanto, la matriz de distancia fue representada de forma intermedia a buena por el dendrograma.

En dicho dendrograma se observa la formación de distintos grupos, algunos de ellos con uno o muy pocos integrantes (Figura 4.6A), e individuos del NEA integrando grupos

junto con individuos de Buenos Aires. Si se considera la distancia 0,67, se conforma un grupo integrado únicamente por individuos provenientes de Misiones, Corrientes y Entre Ríos.

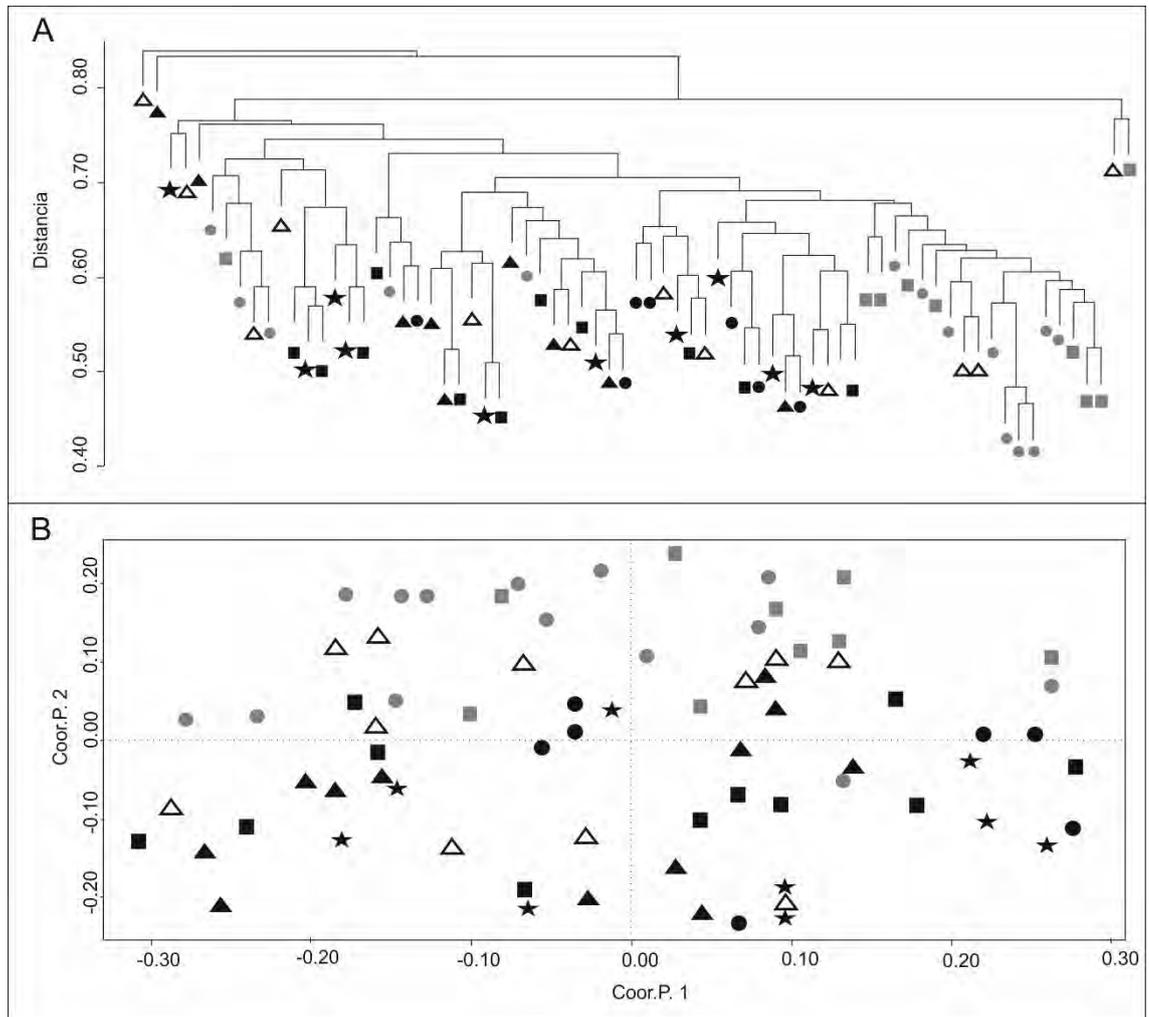


Figura 4.6. Análisis molecular de 73 individuos, pertenecientes a siete introducciones de *Chrysolaela flexuosa* de la Argentina, basado en valores por individuo de 256 bandas polimórficas de marcadores AFLP. A. Dendrograma por método de UPGMA basado en el coeficiente de similitud de Jaccard. B. Análisis de Coordenadas Principales.

Ref.: ■: VdPDFV 26; ●: VdPDFV 45; △: VdPDFV 14; ●: AloEch 1; ★: AloEch 2; ■: AloEch 3; ▲: Nu 1.

Nota: aporte total de las tres primeras coordenadas principales: 20,7%.

4.4.2.3.2. Análisis de ordenamiento

Los A.Coord.P. realizados en base a los valores por individuo, de las bandas polimórficas para cada combinación de cebadores por separado, no arrojaron un agrupamiento tan conciso como el obtenido a partir del uso de las dos combinaciones de cebadores en conjunto. En el gráfico bidimensional realizado a partir del A.Coord.P. conjunto de marcadores moleculares se observó una gran dispersión de los individuos y una tendencia a ordenarse en función de la coordenada 2. Los individuos originarios de Buenos Aires se ubicaron mayoritariamente en el área inferior y central del gráfico, los de Misiones y Corrientes se ubicaron en el área superior y los de Entre Ríos en el área media (Figura 4.6B). Las dos primeras coordenadas contribuyeron a explicar el 19% de la variabilidad.

4.4.3. Afinidad entre las poblaciones en base a caracterización conjunta de caracteres morfológicos, citogenéticos y moleculares

En el gráfico bidimensional obtenido a partir del A.Coord.P. en base a la información conjunta de los caracteres morfológicos, citogenéticos y moleculares por individuo y empleando el coeficiente de similitud de Gower, se observó cierta dispersión de los puntos. Sin embargo, los individuos tendieron a agruparse en función de la coordenada 2, formando estratos levemente definidos por área geográfica originaria. Los individuos de Misiones y Corrientes se ubicaron en el área superior, los de Buenos Aires en el área inferior y los de Entre Ríos en el área media (Figura 4.7). Las dos primeras coordenadas contribuyeron a explicar más del 70% de la variabilidad total.

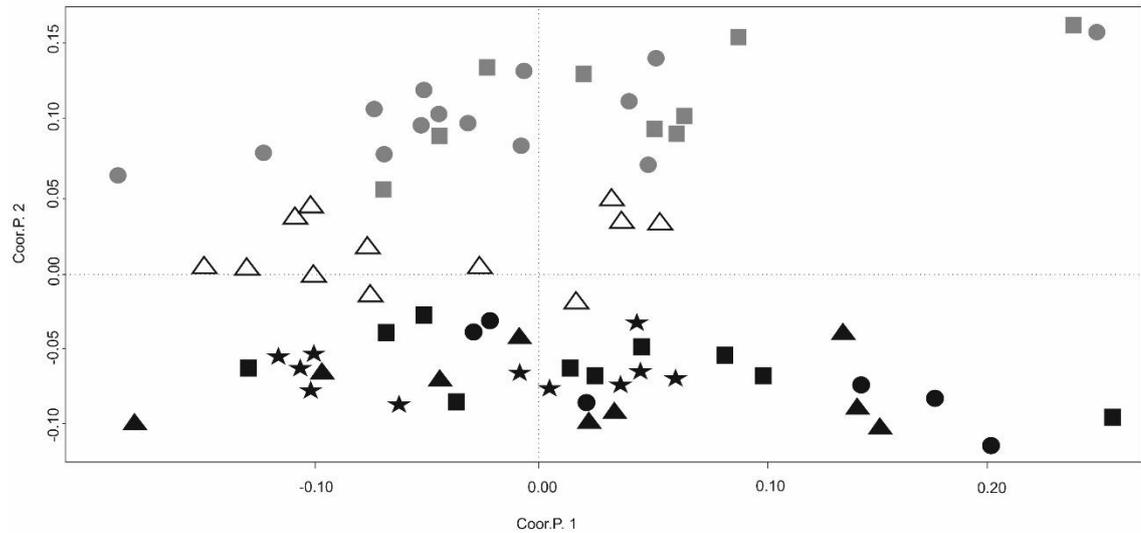


Figura 4.7. Análisis de Coordenadas Principales, en base a datos combinados de ploidía, 26 caracteres morfológicos y 256 bandas polimórficas, obtenidas a partir de marcadores de AFLP, de 73 individuos pertenecientes a siete introducciones de *Chrysolea flexuosa* de la Argentina.

Ref.: ■: VdPDFV 26; ●: VdPDFV 45; △: VdPDFV 14; ●: AloEch 1; ★: AloEch 2; ■: AloEch 3; ▲: Nu 1.

Discusión

Dada la gran cantidad de especies pertenecientes al complejo *Lepidaploa* que prosperan en el sur de Brasil, se ha propuesto que esta región es centro de diversificación de las mismas (Keeley *et al.*, 2007). La evolución de las especies de este grupo se ha dado de forma excéntrica en el resto de Sudamérica. En particular, *Chrysolea flexuosa* ha descendido en el continente americano hasta alcanzar el sudeste de la Provincia de Buenos Aires, en la Argentina. En esta zona, las poblaciones se encuentran únicamente en áreas serranas del Sistema serrano de Tandilia. La caracterización molecular realizada en este trabajo, a partir del índice F_{st} , refleja moderada diferenciación de las introducciones. Por su parte el AMOVA no evidencia diferenciación entre introducciones procedentes de diferentes orígenes geográficos, ni dentro de cada uno de ellos, pero sí alta variabilidad genética intrapoblacional. Estos resultados se ajustan a los esperados en especies alógamas en las cuales se registra notable variabilidad intrapoblacional y poca interpoblacional, en oposición a lo que se observa en las autógamias (ver Camadro *et al.*, 2012).

La utilidad de la técnica de AFLP para investigar relaciones genéticas intraespecíficas ha sido demostrada para muchas especies de la familia Asteraceae, como lechuga,

endivia, achicoria, girasoles silvestres y cultivados, *Achillea*, *Hypochaeris*, *Chrysanthemum*, entre otras (Hill *et al.*, 1996, Kiers, 2000; Quagliaro *et al.*, 2001; Tremetsberger *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2017), pero nunca en miembros del complejo *Lepidaploa*. Algunos de esos trabajos han incluso empleado pocas combinaciones de cebadores para arribar a resultados satisfactorios (Kiers, 2000). Si en lugar de estimar diversidad genética, el objetivo fuera tener una idea más acabada sobre el proceso evolutivo de las poblaciones de *Ch. flexuosa*, sería conveniente emplear un número mayor de combinaciones de cebadores o incluso utilizar marcadores moleculares más potentes, como microsatélites (SSR). Esto permitiría discriminar aún más la información genética de estas poblaciones y ampliar así el estado de conocimiento sobre la diversidad de los grupos genéticos de esta especie.

Los resultados obtenidos a través de la caracterización molecular contrastan con los de la caracterización morfológica y citogenética, donde fue clara la distinción de introducciones de acuerdo al origen geográfico de las mismas. Esta discrepancia podría explicarse teniendo en cuenta estimaciones realizadas en otras Angiospermas donde se ha considerado que entre el 70 y 85% del genoma contiene secuencias de ADN no codificantes (*The Arabidopsis Genome Initiative*, 2000). Consecuentemente, muchos de los fragmentos amplificados en este estudio podrían corresponder a regiones de ADN de ese tipo y, por ende, sin vinculación a funciones fisiológicas o a caracteres observables en el fenotipo. Por lo tanto, para evitar este inconveniente y obtener mayor información lo ideal sería emplear marcadores moleculares relacionados con funciones, aunque los mismos aún no han sido diseñados.

Por su parte, el A.Coord.P. con marcadores moleculares reveló leve asociación entre introducciones provenientes de poblaciones de regiones cercanas. La cercanía entre poblaciones próximas podría propiciar el flujo génico entre las mismas gracias a la acción de polinizadores, y/o corrientes de aire y de agua que actúen como vectores de diásporas y/o granos de polen, facilitando el intercambio interpoblacional de alelos.

Varios autores han propuesto que, en general, en los citotipos poliploides de las Angiospermas se produce una alteración de las características citológicas, bioquímicas, genéticas, fisiológicas y de desarrollo que les permiten adquirir características morfológicas, tolerancias y patrones de crecimiento y/o de desarrollo diferentes a las de los diploides (Stebbins, 1947; Levin, 1983; Otto y Witton, 2000; Levin, 2002; Greilhuber y Leitch, 2013). En tal sentido, se ha encontrado una correlación positiva entre nivel de ploidía y tamaño de órganos vegetales en distintas especies vasculares (Otto y Witton, 2000; Sugiyama, 2005; Balao *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011). A pesar de que en distintas

especies como papa y zanahoria silvestre, entre otras, los poliploides son del mismo tamaño o incluso menores que los diploides, en este estudio se constató que los individuos poliploides de *Ch. flexuosa* presentan mayor tamaño de estructuras vegetativas y reproductivas respecto a los diploides. Por otro lado, se detectaron también diferencias en caracteres cualitativos. Algunos de estos caracteres resultaron exclusivos para cada introducción o para algunas de ellas, por lo que podría tratarse de caracteres determinados por genes cuyos alelos están fijados en las mismas. Las introducciones que se encuentran geográficamente más distanciadas no compartieron ninguno de los atributos cualitativos considerados, mientras que aquellas provenientes de poblaciones más próximas compartieron alguno o hasta la totalidad de los mismos. Al tratarse de una especie que exhibe el comportamiento típico de una alógama, se podría especular que, ante compatibilidad sexual, se produce flujo génico entre poblaciones en función de la distancia. En el caso de la introducción procedente de Entre Ríos es interesante notar que, estando geográficamente ubicada entre medio de las poblaciones de los extremos, es decir, limitando hacia el sur con las de Buenos Aires y hacia el norte con las de Corrientes y Misiones, comparte al menos un carácter con cada una de las restantes introducciones analizadas. Por lo tanto, se trataría de una población que refleja uno de los eslabones de la cadena de dispersión de *Ch. flexuosa*, vinculando a las poblaciones que prosperan en el extremo sur de la distribución de esta especie con aquellas próximas al centro de origen.

Dado que las poblaciones de diferente ploidía no presentan distribución simpátrica, se plantean, al igual que en el trabajo de Echeverría y Camadro (2017), algunas cuestiones sobre la distribución y dinámica ecológica de los diploides y sus descendientes poliploides. ¿Los poliploides escapan del área de distribución de los diploides por ser competidores superiores? ¿O acaso cada nivel de ploidía presenta características fisiológicas y/o fenotípicas particulares que permiten la adaptación a hábitats diferentes? Hall (1972), al trabajar con individuos diploides y tetraploides de centeno (*Secale cereale*), determinó que los tetraploides eran menos tolerantes a las altas temperaturas del suelo que los diploides. A partir de esta observación sugirió que la baja tensión de oxígeno en suelos cálidos podría actuar como una barrera para la propagación de poliploides y por ende contribuir a la distribución diferencial de diploides y tetraploides de esa especie. Se podría hipotetizar que ante modificaciones en el nivel de ploidía surgen nuevas interacciones alélicas, cambios en los patrones de expresión génica y/o nuevos efectos epigenéticos (Madlung *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004; Broz *et al.*, 2009; Balao *et al.*, 2011), dando lugar a respuestas fenotípicas inesperadas o

diferenciales, como la adquisición de tolerancias a determinadas situaciones medioambientales y la reducción o pérdida de otras. Esto podría explicar la ausencia de simpatría en poblaciones de *Ch. flexuosa* con niveles de ploidía diferente, y la distribución sectorizada de las poblaciones diploides, tetraploides y hexaploides de esta especie, que ocupan nichos ecológicos diferentes.

La correlación alta y positiva detectada en los individuos de *Chrysoleaena flexuosa* analizados entre tamaño de órganos vegetativos y reproductivos, y nivel de ploidía, coincide con lo reportado en otras angiospermas, tanto cultivadas como silvestres (Stebbins, 1947; Levin, 1983; Otto y Whitton, 2000; Sugiyama, 2005). Para la obtención de cultivares que combinen atributos deseables de progenitores seleccionados, es necesario que dichos progenitores sean sexualmente compatibles. Por ello, deberían investigarse las relaciones de compatibilidad sexual pre- y post-cigóticas dentro y entre poblaciones, independientemente del origen geográfico y ploidía. La acción de barreras post-cigóticas en el endosperma debido a desbalances en la contribución cromosómica de los progenitores, como ocurre en otros grupos de especies, podrían ser superadas por el funcionamiento de gametos o gametofitos $2n$ (véase Camadro 2012 para un ejemplo en las papas silvestres). De hecho, se detectó la producción de granos de polen $2n$ en todas las introducciones analizadas (Echeverría y Camadro, 2017).

Finalmente, sería valioso comprobar si hay compatibilidad sexual entre *Chrysoleaena flexuosa* y las especies emparentadas que habitan en simpatría en áreas próximas al centro de diversificación del complejo *Lepidaploa* para, eventualmente considerarlas como un “pool” secundario de alelos para la obtención de híbridos de valor ornamental.

4.5. Conclusiones

Respecto a las introducciones argentinas de *Chrysoleaena flexuosa* cultivadas experimentalmente en el Pdo. de Balcarce, Pcia. de Buenos Aires, Argentina:

- (1) el empleo de análisis de tipo multivariado, específicamente el análisis factorial de correspondencia simple -combinando datos de caracteres morfológicos cualitativos y niveles de ploidía-, como el análisis de coordenadas principales -combinando datos de caracteres morfológicos cuali- y cuantitativos, y niveles de ploidía-, permitieron distinguir grupos bien definidos en función del origen geográfico/ploidía de las mismas.

- (2) Se detectó correlación alta y positiva entre el tamaño de órganos, tanto vegetativos como reproductivos, y el nivel de ploidía, que podría ser de utilidad en el mejoramiento genético.
- (3) La utilización de la técnica de marcadores moleculares de tipo AFLP fue apropiada para la detección de variabilidad genética, ya que con el empleo de dos combinaciones de cebadores se obtuvieron más de 250 bandas polimórficas.
- (4) El empleo del índice F_{st} reveló moderada diferenciación genética entre las introducciones, mientras que el análisis molecular de la varianza permitió atribuir el mayor porcentaje de variación molecular a la variación intrapoblacional. Estos resultados fueron respaldados por la utilización de análisis de tipo multivariado empleando, por un lado, caracteres moleculares y, por otro, caracteres combinados de tipo morfológicos, moleculares y ploidía. Este último análisis permitió, también, distinguir grupos en función del origen geográfico/ploidía de las introducciones.

La detección de variabilidad morfológica en caracteres cuali y cuantitativos de interés ornamental en las introducciones estudiadas permitiría la utilización este germoplasma en programas de mejoramiento genético con fines comerciales. Por su parte, los distintos niveles de ploidía, que en muchos casos se reflejaron como variaciones en el tamaño de algunos órganos, podrían constituir una herramienta para la obtención de cultivares comerciales con atributos cuantitativos particulares.

Para obtener mayor información sobre la composición genética de esta especie y desentrañar las conexiones evolutivas entre plantas diploides y poliploides sería conveniente realizar un muestreo geográfico más amplio de las poblaciones naturales. A su vez, si bien la información obtenida mediante el uso de marcadores de AFLP fue de utilidad para caracterizar las introducciones analizadas, aumentando el número de cebadores de AFLP y/o avanzando en el diseño de marcadores co-dominantes para esta especie, se podría ampliar el conocimiento sobre la diversidad de los grupos genéticos de esta especie con vista a su conservación y utilización.

5. CONCLUSIONES GENERALES

Respecto a las hipótesis planteadas para el presente trabajo se concluye:

- Hipótesis 1: Se acepta que, de todas las poblaciones de *Chrysolaena flexuosa* analizadas, sólo son hexaploides ($2n=6x=60$) las poblaciones del Sistema serrano de Tandilia.
- Hipótesis 2-1: Se acepta que, al ser cultivadas en el SE bonaerense durante dos ciclos de crecimiento (dos ambientes), las poblaciones de *Chrysolaena flexuosa* del Sistema serrano de Tandilia y del NEA se diferencian en los caracteres morfológicos evaluados: número de hojas, tamaño foliar, color de flor, tamaño de capítulos, número de capítulos por vara floral y altura de varas florales.
- Hipótesis 2-2: Se acepta que, al ser cultivadas en el SE bonaerense durante dos ciclos de crecimiento (dos ambientes), las poblaciones de *Chrysolaena flexuosa* del Sistema serrano de Tandilia y del NE de la Argentina difieren en sus etapas fenológicas.
- Hipótesis 3: Se acepta que la variabilidad morfológica presente entre y dentro de las poblaciones de *Chrysolaena flexuosa* tiene base genética detectable mediante el uso de marcadores moleculares de AFLP.

Con los resultados del presente trabajo se obtuvo información que permite hipotetizar que el fenómeno de poliploidización sexual ha sido una vía de origen de los poliploides de esta especie. Por otra parte, y como aporte a la taxonomía de las poblaciones de *Chrysolaena flexuosa* de la Argentina, se detectaron diferencias morfológicas, citogenéticas y moleculares entre las poblaciones del NE de la Argentina y las del SE de la provincia de Buenos Aires. Las diferencias entre las poblaciones se acentúan a medida que las mismas se alejan del centro de origen, al sur de Brasil.

La variabilidad morfológica detectada en este trabajo para las introducciones de *Ch. flexuosa* tiene base genética, lo que permitiría incorporar a esta especie en un programa de mejoramiento genético cuyo objetivo sea la obtención de cultivares con fines ornamentales.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ABADIE, T.; BERRETTA, A. 2001. Caracterización y evaluación de recursos fitogenéticos. En: BERRETTA, A.; RIVAS, M. (coord.) Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur. PROCISUR, Montevideo, Uruguay. pp. 89-97.
- ALONSO, S.I.; GUMA, I.R.; NUCIARI, M.C.; VAN OLPHEN, A. 2009. Flora de un área de la Sierra La Barrosa (Balcarce) y fenología de especies nativas con potencial ornamental. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo. 41(2): 23-44.
- ANGULO, M.B.; DEMATTEIS, M. 2013. Nuclear DNA content in some species of *Lessingianthus* (Vernonieae, Asteraceae) by flow cytometry. Journal of Plant Research. 126(4): 461-468.
- ARRIGO, N.; TUSZYNSKI, J.W.; EHRICH, D.; GERDES, T.; ALVAREZ, N. 2009. Evaluating the impact of scoring parameters on the structure of intra-specific genetic variation using RawGeno, an R package for automating AFLP scoring. BMC Bioinformatics. 10(1): 33.
- BALAO, F.; HERRER, J.; TALAVERA, S. 2011. Phenotypic consequences of polyploidy and genome size at the microevolutionary scale: a multivariate morphological approach. New Phytologist. 152(1): 256–265.
- BALMFORD, A.; BRUNER, A.; COOPER, P.; COSTANZA, R.; FARBER, S.; GREEN, R.E.; MUNRO, K. 2002. Economic reasons for conserving wild nature. Science. 297(5583): 950-953.
- BANCHEVA, S.; GREILHUBER, J. 2006. Genome size in Bulgarian *Centaurea* s.l. (Asteraceae). Plant Systematics and Evolution. 257(1-2): 95-117.
- BECKER, H.C. 1981. Correlations among some statistical measures of phenotypic stability. Euphytica. 30(3):835-840.
- BLÁZQUEZ, M.; KOORNNEEF, M.; PUTTERILL, J. 2001. Flowering on time: genes that regulate the floral transition. EMBO (European Molecular Biology Organization) reports. 12(2): 1078-1082.
- BLÁZQUEZ, M.; WEIGEL D. 2000. Integration of floral inductive signals in Arabidopsis. Nature. 404(6780): 889-892.
- BOSS, P.K.; BASTOW, R.M.; MYLNE, J.S.; DEAN, C. 2004. Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. The Plant Cell. 16(1):18-31.
- BREMER, K. 1994. Branch support and tree stability. Cladistics. 10(3): 295-304.
- BRETAGNOLLE, F.A.; THOMPSON, J.D. 1995. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. New Phytologist. 129(1): 1-22.

- BROZ A.; MANTER D.; BOWMAN G.; MULLER-SCHARER, H.; VIVANCO, J. 2009. Plant origin and ploidy influence gene expression and life cycle characteristics in an invasive weed. *BMC Plant Biology*. 9(1): 33.
- BURGUEÑO, G.; NARDINI, C. 2009. Introducción al paisaje natural. Diseño de espacios con plantas nativas rioplatenses. Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires, Argentina. 476 p.
- CABRERA A.L. 1963. Flora de la Provincia de Buenos Aires. Compuestas. Colección Científica del INTA, Buenos Aires, Argentina, 443 p.
- CAMADRO, E.L. 1986. Los gametos $2n$ en el origen y la evolución de las angiospermas poliploides. *Mendeliana*. 7(2): 85-100.
- CAMADRO, E.L. 2012. Relevance of the genetic structure of natural populations, and sampling and classification approaches for conservation and use of wild crop relatives: potato as an example. *Botany*. 90(11): 1065-1072.
- CARPUTO, D.; CAMADRO, E.L.; PELOQUIN, S.J. 2006. Terminology for polyploids based on cytogenetic behavior: consequences in genetics and breeding. *Plant Breeding*. 26: 105-124.
- CARPUTO, D.; FRUSCIANTE, L.; PELOQUIN, S.J. 2003. The role of $2n$ gametes and endosperm balance number in the origin and evolution of polyploids in the tuber-bearing *Solanum*. *Genetics*. 163(1): 287-294.
- CASANOVES, F.; BALZARINI, M. 2002. Predictores lineales insesgados (BLUP) en ensayos comparativos de rendimiento. *Journal of Basic & Applied Genetics*. 14(3): 55-62.
- CHRTEK, J.; ZAHRADNÍČEK, J.; KRAK, K.; FEHRER, J. 2009. Genome size in *Hieracium* subgenus *Hieracium* (Asteraceae) is strongly correlated with major phylogenetic groups. *Annals of Botany*. 104(1): 161-178.
- CRISCI, J.; FREIRE, S.; SANCHO, G.; KATINAS, L. 2001. Historical biogeography of the Asteraceae from Tandilia and Ventania mountain ranges (Buenos Aires, Argentina). *Caldasia*. 23: 21-41.
- CRUZ MEDINA, R. 1992. Some exact conditional tests for the multiplicative models to explain genotype-environment interaction. *Heredity*. 69: 128-132.
- CUADRAS, C.W. 2014. Nuevos métodos de análisis multivariante. CMC Editions. Barcelona, España. 305 p.
- DATTA, S.K.; CHAKRABARTY, D. 2016. Classical and modern methods for characterization of ornamental crops. *International Journal of Horticulture*. 5(21):1-45
- DEMATTEIS, M. 2007. Taxonomic notes on the genus *Chrysolaena* (Vernonieae, Asteraceae), including a new species endemic to Paraguay. *Annales Botanici Fennici*. 44: 56-64.

- DEMATTEIS, M. 2009. Revisión taxonómica del género sudamericano *Chrysolaena* (Vernonieae, Asteraceae). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 44(1-2): 103-170.
- DEMATTEIS M. 2014. Tribu Vernonieae Cass. En: Zuloaga, F.O.; Belgrano, M.J.; Anton, A.M. (eds.) Flora Argentina. Flora vascular de la República Argentina. IBODA - CONICET, Buenos Aires, Argentina. pp. 229–287.
- DEMATTEIS, M.; VÍA DO PICO, G.M.; BAHIMA, J.V.; BAYÓN, N.D. 2017. *Chrysolaena* H. Rob. En: Hurrel, J.A.; Bayón, N.D.; Delucchi, G. (eds.) Plantas cultivadas de la Argentina. Asteráceas (=Compuestas). Hemisferio Sur, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. pp. 496-497.
- DOLEŽEL, J.; GÖHDE, W. 1995. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. Cytometry. 19(2): 103-106.
- DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J.A.N. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. Annals of Botany. 95(2): 99-110.
- DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. Nature Protocols. 2(9): 2233-2244.
- ECHEVERRÍA, M.L.; ALONSO, S.I. 2012. Crecimiento inicial bajo cultivo de *Chrysolaena flexuosa* (Sims) H. Rob., Asteraceae nativa de valor ornamental potencial. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo. 44(2): 89-98.
- ECHEVERRÍA, M.L.; CAMADRO, E.L. 2017. Chromosome numbers, meiotic abnormalities, and 2n pollen formation in accessions of the wild species *Chrysolaena flexuosa* (Sims) H. Rob. (Vernonieae, Compositae) from its distribution range in Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 52 (4): 737-752.
- EMSWELLER, S.L. y RUTTLE, M. L. 1941. Induced polyploidy in floriculture. The American Naturalist. 75(759): 310-328.
- ERIKSSON, S.; BÖHLENIUS, H.; MORITZ, T.; NILSSON, O. 2006. GA₄ Is the Active Gibberellin in the Regulation of LEAFY Transcription and Arabidopsis Floral Initiation. The Plant Cell. 18: 2172–2181.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics. 1: 47-50.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics. 31(2):479-91.
- FALCONER, D.E. 1986. Introducción a la genética cuantitativa. Cecsá, México D.F., México. 430 p.

- FAO. 2017. Informe sobre el estado de los recursos fitogenéticos en el mundo. Conferencia Técnica Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos Leipzig, Alemania [en línea] < <http://www.fao.org/3/a-l7658s.pdf> > [consulta: 04 de septiembre de 2017].
- FAUBA. 2017. Cálculo de parámetros astronómicos. Cátedra de Climatología y Fenología Agrícolas, Facultad de Agronomía de la UBA. [en línea]: <<http://en.agro.uba.ar/catedras/clima/info>> [consulta: 9 de febrero de 2017].
- FEHR, W.R. 1987. Principles of cultivar development: theory and technique Vol I. Ed: Macmillan, New York. 768 p.
- FELDMAN, M.; LEVY, A.A. 2005. Allopolyploidy - a shaping force in the evolution of wheat genomes. *Cytogenetic and Genome Research*. 109(1-3): 250-258.
- FRANGI, J. 1975. Sinopsis de las comunidades vegetales y el medio de las sierras de Tandil (Provincia de Buenos Aires). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 16(4): 293-318.
- GOWER, J.C. 1971. A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics*. 27: 857-874.
- GREILHUBER, J.; LEITCH, I.J. 2013. Genome size and the phenotype. In: Leitch, I.J.; Greilhuber, J.; Dolezel, J.; Wendel, J.F. (eds.) *Plant genome diversity*, Vol. 2. Springer, Viena, Austria. pp. 323–340.
- GUO, Y.P.; SAUKEL, J.; MITTERMAYR, R.; EHRENDORFER, F. 2005. AFLP analyses demonstrate genetic divergence, hybridization, and multiple polyploidization in the evolution of *Achillea* (Asteraceae-Anthemideae). *New Phytologist*. 166(1): 273-290.
- GULIA, S. K.; SINGH, B. P.; CARTER, J.; GRIESBACH, R. J. 2009. Daylily: Botany, Propagation, Breeding. In: Janick, J. (ed.) *Horticultural reviews*. Vol. 35. Wiley-Blackwell, Nueva Jersey, Estados Unidos. pp. 193–220.
- HALL, O. 1972. Oxygen requirement of root meristems in diploid and tetraploid rye. *Hereditas*. 70(1): 69-74.
- HAN, J.; HU, N.; LI, Y.G.; SHANG, F.D. 2007. Genetic diversity of *Chrysanthemum* cultivars revealed by AFLP analysis. *Acta Horticulturae Sinica*. 34(4):1041.
- HAYMES, K.M. 1996. A DNA mini-prep method suitable for a plant breeding program. *Plant Molecular Biology Reporter*. 14(3): 280-284.
- HENRY, R.J. 2013. *Molecular markers in plants*. Wiley-Backwell, Queensland, Australia, 196 p.
- HERMAN, P.P. J.; SWELANKOMO, N. 2011. Asteraceae. *Bothalia*. 41(1): 176-178.
- HILL, M.; WITSENBOER, H.; ZABEAU, M.; VOS, P.; KESSELI, R.; MICHELMORE, R. 1996. PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theoretical and Applied Genetics*. 93(8):1202-1210.

- HUNZIKER, J.; ESCOBAR, C.; XIFREDA, C.C.; GAMERRO, J.C. 1990. Estudios citológicos en Compositae. VI. Darwiniana. 30: 115–121.
- INTA, 2018. Catálogo de variedades ornamentales del INTA [en línea]: <https://inta.gob.ar/busqueda/tipo-de-contenido/variedades/grupo-variedad/ornamentales-7906/p/buscar/> [consulta: 27 de febrero de 2018].
- INTA Informa, 2017. Flores nativas: cuando los beneficios se comparten con el lugar de origen [en línea]: <<http://intainforma.inta.gov.ar/?p=35523>> [consulta: 22 de noviembre de 2017].
- INTEA. 2003. Estudio sobre la caracterización de la producción florícola en la República Argentina. JICA-INTA. Innovaciones Tecnológicas Agropecuarias S.A., Buenos Aires, Argentina. [en línea]: <<https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-agradecimiento.pdf>> [consulta: 22 de noviembre de 2017].
- JONES, R.N.; LANGDOM, T. 2013. The plant nucleus at war and peace: genome organization in the interphase nucleus. In: Leitch, I.J.; Greilhuber, J.; Doležel, J.; Wendel, J.F. (eds.). Plant genome diversity, Vol. 2. Springer, Nueva York, Estados Unidos. pp. 13–31.
- JONES, S.B. 1979. Chromosome numbers of Vernoneae (Compositae). Bulletin of the Torrey Botanical Club. 106(2): 79-84.
- JONES, S.B. 1981. Revision of *Vernonia* series Flexuosae (Compositae: Vernoneae). Brittonia 33(2): 214-224.
- KANG, M.S.; H.G. GAUCH, Jr. 1996. Genotype by environment interaction. CRC Press, Boca Raton, Estados Unidos. 416 p.
- KEELEY, S.C.; FORSMAN, Z.H.; CHAN, R. 2007. A phylogeny of the “evil tribe” (Vernoneae: Compositae) reveals Old/New World long distance dispersal: Support from separate and combined congruent datasets (trnL-F, ndhF, ITS). Molecular Phylogenetics and Evolution. 44(1): 89–103.
- KIERS, A.M. 2000. Endive, chicory, and their wild relatives. A systematic and phylogenetic study of *Cichorium* (Asteraceae). Gorteria-Supplemen. 5(1): 1-77.
- KRIZEK, B.A.; FLETCHER, J.C. 2005. Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. Nature Reviews Genetics. 6(9): 688-698.
- KODURU, P.R.K.; RAO, M.K. 1981. Cytogenetics of synaptic mutants in higher plants. Theoretical and Applied Genetics. 59(4): 197-214.
- KUMAR, P.; SINGHAL, V.K. 2011. Chromosome number, male meiosis and pollen fertility in selected angiosperms of the cold deserts of Lahaul-Spiti and adjoining areas (Himachal Pradesh, India). Plant Systematics and Evolution. 297(3-4): 271-297.
- LARROSA, F.H.; MAUNE, J.F.; ERAZZÚ, L.E.; CAMADRO; E.L.. 2012. Meiotic abnormalities underlying pollen sterility in wild potato hybrids and spontaneous populations. Plant Biology. 14(1): 223-233.

- LEITCH, I.J.; LEITCH, A.R. 2013. Genome size diversity and evolution in land plants. In: Greilhuber, J.; Doležel, J.; Wendel, J.F. (eds.). *Plant Genome Diversity*, Vol. 2. Springer, Vienna, Austria. pp. 307-322.
- LEITCH, I.J.; BENNETT, M.D. 2004. Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society*. 82(4): 651–663.
- LEVIN, D.A. 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. *The American Naturalist*. 122(1): 1-25.
- LEVIN, D.A. 2002. *The role of chromosomal change in plant evolution*. Oxford University Press, New York, Estados Unidos, 230 p.
- MA, X.F.; GUSTAFSON, J.P. 2006. Timing and rate of genome variation in *Triticale* following allopolyploidization. *Genome*. 49(8): 950–958.
- MADLUNG, A.; MASUELLI, R.W.; WATSON, B.; REYNOLDS, S.H.; DAVISON, J.; COMAI, L. 2002. Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic *Arabidopsis allotetraploids*. *Plant Physiology*. 129(2): 733–746.
- MARIOTTI, J. A. 1986. *Fundamentos de genética biométrica. Aplicaciones al mejoramiento genético vegetal*. Monografía no. 32. OEA, Washington D.C. Estados Unidos. 152 p.
- MARTÍNEZ, M. C.; HELGUERA, M.; CARRERA, A. 2010. Marcadores moleculares. En: Levitus, G.; Echenique, G.; Rubeinstein, C.; Hopp, E.; Mroginskri, L. (eds.) *Biología y mejoramiento vegetal II*. INTA–Argenbio. Buenos Aires, Argentina. pp. 70 – 75.
- McCLINTOCK, B. 1984. The significance of responses of the genome to challenge. *Science*. 22: 792-801.
- MENDIBURU, A.O.; PELOQUIN, S.J. 1976. Sexual polyploidization and depolyploidization: some terminology and definitions. *TAG Theoretical and Applied Genetics*. 48(8): 137-143.
- MOK, D.W.S.; PELOQUIN, S.J. 1975a. Three mechanisms of 2n pollen formation in diploid potatoes. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. 17(2): 217-225.
- MOK, D.W.S.; PELOQUIN, S.J. 1975b. The inheritance of three mechanisms of diplandroid (2n pollen formation) in diploid potatoes. *Heredity*. 35(3): 295-302.
- MORISIGUE, D.E.; MATA, D.A.; FACCIUTO, G.; BULLRICH, L. 2012. *Floricultura. Pasado y presente de la Floricultura Argentina*. Instituto de Floricultura. INTA, Buenos Aires. 36 p.
- MOZO, J. 2016: *Distribución geográfica y detección de áreas prioritarias para la colecta de germoplasma de Solanum commersonii Dunal mediante el uso de sistemas de información geográfica*. Tesis Ingeniería Agronómica. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Mar del Plata, Buenos Aires., Argentina. 45 p.

- NUEZ VIÑALS, F.; CARRILLO BECERRIL, J.M. 2000. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Sociedad española de genética. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Universidad Politécnica de Valencia. Editorial U. P. V. Valencia, España. 579 p.
- OTTO, S.P.; WHITTON, J. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*. 34(1): 401-437.
- OZKAN, H.; LEVY, A.A.; FELDMAN, M. 2001. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *The Plant Cell*. 13(8): 1735-1747.
- PELLICER J., GARCIA, S.; GARNATJE T.; HIDALGO, O.; KOROBKOV, A.A.; DARIIMAA, S.; VALLÉS, J. 2007. Chromosome counts in Asian *Artemisia* L. (Asteraceae) species: from diploids to the first report of the highest polyploid in the genus. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 153(3): 301-310.
- PELOQUIN, S.J.; BOITEUX, L.S.; CARPUTO, D. 1999. Meiotic mutants in potato: valuable variants. *Genetics*. 153(4): 1493-1499.
- PICCA, A.; HELGUERA, M.; SALOMÓN, N.; CARRERA, A. 2004. Marcadores moleculares. En: Echenique, V.; Rubinstein, C. y Mroginski, L. (eds.) *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Ediciones INTA, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. pp 61-68.
- PIEPHO, H.P; MÖHRING, J. 2006. Selection in cultivar trials—is it ignorable? *Crop Science*. 46(1): 192-201.
- PINHEIRO, J.; BATES, D.; DEBROY, S.; SARKAR, D.; R CORE TEAM. 2009. nlme: Linear and nonlinear mixed effects models. R package version. 3.1-96.
- PODWYSZYŃSKA, M.; GABRYSZEWSKA, E.; DYKI, B. STEPOWSKA, A.A.; KOWALSKI, A.; JASIŃSKI, A. 2014. Phenotypic and genome size changes (variation) in synthetic tetraploids of daylily (*Hemerocallis*) in relation to their diploid counterparts. *Euphytica*. 203(1): 1-16.
- QUAGLIARO, G.; VISCHI, M; TYRKA, M.; OLIVIERI, A.M. 2001. Identification of wild and cultivated sunflower for breeding purposes by AFLP markers. *The Journal of Heredity*. 92(1): 38-42.
- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 29(1): 467-501.
- RIMIERI, P. 2017. La diversidad genética y la variabilidad genética, dos conceptos diferentes asociados al germoplasma y al mejoramiento genético. *Journal of Basic & Applied Genetics*. 28(2): 7-13.
- ROBINSON, H. 1987a. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae) I. The genus *Stenocephalum* Sch. Bip. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 100: 578-583.

- ROBINSON, H. 1987b. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae) II. A new genus, *Echinocoryne*. Proceedings of the Biological Society of Washington. 100: 584-589.
- ROBINSON H. 1987c. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae) III. Two new genera, *Cyrtocymura* and *Eirmocephala*. Proceedings of the Biological Society of Washington. 100: 844-855.
- ROBINSON, H. 1988a. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae) V. The new genus *Chrysolaena*. Proceedings of the Biological Society of Washington. 101: 952-958.
- ROBINSON, H. 1988b. Studies in the *Lepidaploa* complex (Vernonieae: Asteraceae) IV. The new genus *Lessingianthus*. Proceedings of the Biological Society of Washington. 101: 929-951.
- ROBINSON, H. 1999. Generic and subtribal classification of American Vernonieae. Smithsonian Contributions to Botany. 89: 1-116.
- ROBINSON, H.; SKVARLA, J.J. 2007. Studies on the Gymnantheminae (Asteraceae: Vernonieae). II: a new genus, *Decaneuropis*, from China, India, Southeast Asia, and Malaysia. Proceedings of the Biological Society of Washington. 120(3): 359-366.
- ROUX, N.; TOLOZA, A.; RADECKI, Z.; ZAPATA-ARIAS, F.J.; DOLEZEL, J. 2002. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. Plant Cell Reports. 21(5): 483-90.
- RUAS, P.M.; RUAS, C.F.; VIEIRA, O.S.; MATZENBACHER, N.I.; MARTINS, N.S. 1991. Cytogenetics of genus *Vernonia* Schreber (Compositae). Cytologia 56(2): 239-247.
- SABATINO, M.; FARINA, J.; MACEIRA, N. 2017. Flores de las sierras de Tandilia. Guía para el reconocimiento de sus plantas y sus visitantes florales. Ediciones INTA, Balcarce, Argentina. 160 p.
- SARKAR, D. 2008 Lattice. Multivariate data visualization with R. Springer, Nueva York, Estados Unidos. 268 p.
- SHAKED, H.; KASHKUSH, K.; OZKAN, H.; FELDMAN, M.; LEVY, A.A. 2001. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. The Plant Cell. 13(8): 1749-1759.
- SINGH, R.J. 2003. Plant cytogenetics. CRC press, Florida, Estados Unidos. 488 p.
- SMITH, T.W.; WALINGA, C.; WANG, S.; KRON, P.; SUDA, J.; ZALAPA, J. 2015. Evaluating the relationship between diploid and tetraploid *Vaccinium oxycoccos* (Ericaceae) in eastern Canada. Botany. 93(10): 623-636.
- SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. Proceedings of the National Academy of Sciences. 97(13): 7051-7057.

- SOLTIS, D.; CHANDERBALI, A.S.; SANGTAE, K.; BUZGO, M.; SOLTIS, P. 2007. The ABC model and its applicability to basal angiosperms. 2007. *Annals of Botany* 100(2): 155-163.
- STEBBINS, G.L. 1947. Types of polyploids: their classification and significance. *Advances in Genetics*. 1: 403-429.
- STROUP, W.W. 2000. Mixed models issues in the analysis of multi-location trials. In: The 20th. International Biometrics Conference, Vol. II. University of California, Berkeley, Estados Unidos. pp. 135–142.
- SUDA, J.; ARON, P.; HUSBAND, B.; TRÁVNÍČEK, P. 2007. Flow cytometry and ploidy: applications in plant systematics, ecology and Evolutionary Biology. In: Dolezel, J.; Greilhuber, J.; Suda, J. (eds.) *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*. Wiley-VCH, Weinheim, Alemania. pp. 103-130.
- SUGIYAMA, S.I. 2005. Polyploidy and cellular mechanisms changing leaf size: comparison of diploid and autotetraploid populations in two species of *Lolium*. *Annals of Botany*. 96(5): 931-938.
- TEAM R. 2012. Development core. R: A language and environment for statistical computing. [en línea]: < <http://www.R-project.org> > [consulta: 30 de julio de 2017].
- THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408(6814): 796-815.
- TORRELL, M.; VALLÉS, J. 2001: Genome size in 21 *Artemisia* L. species (Asteraceae, Anthemideae): Systematic, evolutionary, and ecological implications. *Genome*. 44(2): 231-238.
- TREMETSBERGER, K.; STUESSY, T.F.; GUO, Y.P.; BAEZA, C.M.; WEISS, H.; SAMUEL, R.M. 2003. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) variation within and among populations of *Hypochaeris acaulis* (Asteraceae) of Andean southern South America. *Taxon*. 52(2): 237-245.
- VÄINÖLÄ, A. 2000. Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. *Euphytica*. 112(3): 239-244.
- VAN TUYL, J.M. y LIM, K.B. 2003. Interspecific hybridisation and polyploidisation as tools in ornamental plant breeding. *Acta Horticulturae*. 612: 13-22.
- VEILLEUX, R.E.; MCHALE, N.A.; LAUER, F.I. 1982. 2n gametes in diploid *Solanum*: frequency and types of spindle abnormalities. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. 24(3): 301-314.
- VIA DO PICO, G.M.; DEMATTEIS, M. 2012. Chromosome number, meiotic behaviour and pollen fertility of six species of *Chrysoleaena* (Vernonieae, Asteraceae). *Caryologia*. 65(3): 176-181.

- VIA DO PICO, G.M.; DEMATTEIS, M. 2013. Karyotype analysis and DNA content in some species of *Chrysolea* (Vernonieae, Asteraceae). *Plant Biosystems*. 147(4): 864-873.
- VOS, P.; HOGER, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research*. 23(21): 4407–4414.
- WANG, J.; TIAN, L.; MADLUNG, A.; LEE, H-S.; CHEN, M.; LEE, J.J.; WATSON, B.; KAGOCHI, T.; COMAI, L.; CHEN, Z.J. 2004. Stochastic and epigenetic changes of gene expression in *Arabidopsis* Polyploids. *Genetics*. 167(4): 1961–1973.
- WU, J.H.; FERGUSON, A.R.; MURRAY, B.G.; JIA, Y.; DATSON, P.M.; ZHANG, J. 2011. Induced polyploidy dramatically increases the size and alters the shape of fruit in *Actinidia chinensis*. *Annals of Botany*. 109(1): 169-179.
- ZALBA, S.M.; VILLAMIL, C.B. 2002. Woody plant invasion in relictual grasslands. *Biological Invasions*. 4(1): 55-72.
- ZLESAK, D.C., THILL, C.A., y ANDERSON, N.O. 2005. Trifluralin-mediated polyploidization of *Rosa chinensis minima* (Sims) Voss seedlings. *Euphytica*. 141(3), 281-290.
- ZULOAGA, F.O.; MORRONE, O.; RODRIGUEZ, D. 1999. Análisis de la biodiversidad en plantas vasculares de la Argentina. *Kurtziana*. 27(1):17-167.

7. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

- ECHEVERRÍA, M.L.; ECHEVERRÍA, M.M.; CAMADRO, E.L. 2013a. Caracterización fenotípica de poblaciones naturales de *Chrysolaena flexuosa* (Sims) H. Rob. en el sudeste bonaerense. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 48 (Suplemento): 251-250.
- ECHEVERRÍA, M.L.; ECHEVERRÍA, M.M.; CAMADRO, E.L. 2013b. Fenología de poblaciones naturales de *Chrysolaena flexuosa* (Sims) H. Rob. en el sudeste bonaerense. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 48 (Suplemento): 250.
- ECHEVERRÍA, M.L.; ECHEVERRÍA, M.M.; CAMADRO, E.L. 2014. Números cromosómicos en poblaciones naturales de *Chrysolaena flexuosa* (Sims) H. Rob. del sudeste bonaerense. Journal of Basic and Applied Genetics. 26(1): 92.
- ECHEVERRÍA, M.L.; CAMADRO, E.L. 2015. Aberraciones meióticas en *Chrysolaena flexuosa* (Sims) H. Rob.: indicios de hibridación y poliploidización sexual en el Complejo Lepidaploa. Journal of Basic and Applied Genetics. 27(1): 83.
- ECHEVERRÍA, M.L.; CAMADRO, E.L. 2016. Contenido de ADN en poliploides de *Chrysolaena flexuosa* (Sims) H. Rob. de la Argentina. Journal of Basic and Applied Genetics. 28(1): 107.
- ECHEVERRÍA, M.L.; CAMADRO, E.L. 2017. Chromosome numbers, meiotic abnormalities, and 2n pollen formation in accessions of the wild species *Chrysolaena flexuosa* (Sims) H. Rob. (Vernonieae, Compositae) from its distribution range in Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 52(4): 737-752.