

**CARACTERÍSTICAS Y MECANISMOS FUNCIONALES
INVOLUCRADOS EN LA ECOFISIOLOGÍA DE
Flourensia campestris Y *Flourensia oolepis* (Asteraceae)**

*Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Agropecuarias, Escuela para
Graduados “Alberto Soriano”, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.*

Mariana Paola Silva
Bióloga (2004)
Universidad Nacional de Córdoba

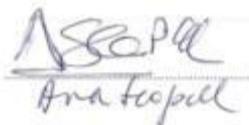
Facultad de Agronomía Sede Punilla. Universidad de Buenos Aires.
Laboratorio Estación de Biología Sierras.



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis
Ana Leonor Scopel
Ingeniero Agrónomo, MSc, PhD



A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'ASOPAL' above a horizontal line, with 'Ana Scopel' written below it in a cursive script.

Asesor de Estudios
Leonardo Alberto Piazza
Bioquímico (UNC)
Doctor en Ciencias Químicas (UNC)

JURADO DE TESIS

Director de tesis
Ana Leonor Scopel
Ingeniero Agrónomo, MSc, PhD

JURADO
Diego Medan
Ingeniero Agrónomo, Doctor Rerum Naturalium.

JURADO
Doctora Sara Beatriz Maldonado
Bióloga. Doctora en Ciencias Biológicas.

JURADO
Doctor Rodolfo Mendoza.
Ingeniero Agrónomo. Doctor en Ciencias Agronómicas.

JURADO
Doctora Adriana Graciela Kantolic
Ingeniera Agrónoma. Doctora en Ciencias Agropecuarias.

Fecha de defensa de la tesis
30 de octubre de 2012

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres por haberme acompañado e incentivado en cada momento. Sin su apoyo incondicional hubiese resultado sumamente difícil concretar esta etapa tan importante.

Ana, no alcanzan las palabras para expresar lo que siento. Gracias por haber confiado en mí desde el comienzo. Mi diste alas, una libertad que es difícil encontrar en un director. Este trabajo no solo nos permitió compartir momentos laborales, nos dejó ir un poco más allá, me abriste las puertas del laboratorio y de tu familia compartiendo muchos momentos felices y algunos más difíciles. Simplemente gracias por todo lo que aprendí a tu lado, por haberme acompañado en lo profesional y en lo personal todos estos años. Encontré en vos una amiga, por eso estaré eternamente agradecida.

Mónica, compañera y amiga, llegamos al momento final. Cuántas cosas compartidas, cuántos momentos, pero aquí estamos mas allá de todo lo sucedido. Simplemente gracias, por los días invertidos con preparados, redacciones y discusiones de toda índole. Sin tu apoyo y aportes el cierre de esta etapa hubiese costado bastante.

A Leo, por su apoyo, su empuje y sus aportes en la química. Gracias por haberme corregido la tesis, por tus consejos y sobre todo por haberme ayudado a que este capítulo llegue a un excelente final.

A Leo, Daniela, Augusto, Marisa y Tomás, por su ayuda y consejos. Por acompañarme siempre, no sólo con la tesis, sino en la vida en general. Por tantos mates y charlas compartidas, por ser tan buenos amigos y compañeros.

A mis amigos del alma y de toda la vida, porque sin su incansable apoyo en todos estos años no hubiese terminado esta tesis, por creer siempre en mí y estar a mi lado en las buenas y en las malas.

DECLARACIÓN

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO 1.....	3
Introducción general.....	3
1.1.- Situación actual y estado del conocimiento sobre las especies nativas.	4
1.2.- Adaptaciones morfológicas y funcionales de las plantas frente a factores de estrés.	5
1.3.- Metabolitos secundarios: funciones, importancia y actividad biológica en poblaciones naturales.	6
1.4.- Micorrizas: su rol en ecosistemas naturales.	7
1.5.- El género <i>Flourensia</i>	8
1.5.1.- <i>Flourensia campestris</i> Griseb., Abh. Konigl. Ges. Wiss. Göttingen 19: 184.1874.....	8
1.5.2.- <i>Flourensia oolepis</i> S. F. Blake, Contr. U. S. Natl. Herb. 20 (1): 406.1921.....	10
1.6.- Ubicación, Fisiografía y Clima del área de estudio.....	11
1.6.1.- Áreas de estudio.....	12
1.6.2.- Caracterización de los suelos (INTA Manfredi, 2003).....	14
2.- Objetivos e hipótesis de la investigación	14
Objetivos específicos	14
Hipótesis 1:	15
Hipótesis 2:	15
Hipótesis 3:	16
3.- Desarrollo de la investigación	16
CAPÍTULO 2.....	17
Adaptaciones morfológicas y anatómicas involucradas en la persistencia de <i>Flourensia campestris</i> y <i>Flourensia oolepis</i> en ambientes naturales.	17
2.1.- Introducción	18
2.2.- Materiales y métodos.....	21
2.2.1.- Material Vegetal	21
2.2.1.1.-Área de Muestreo.....	21
2.2.1.2. Muestreo.....	21
2.2.2.- Exomorfología y Arquitectura.....	21
2.2.3.- Endomorfología.....	21
2.2.3.1.- Microscopía óptica.....	21
2.2.3.2.- Microscopía óptica de Fluorescencia (MOF).	22
2.2.3.3.- Microscopía electrónica.....	22
2.2.3.4.- Cuantificación de tricomas glandulares, conductos resiníferos en las distintas estructuras y naturaleza de las sustancias secretadas.	22
2.2.4.- Micorrizas Arbusculares (MA).....	23
2.2.4.1.- Detección y caracterización de MA.....	23
2.2.4.2.- Efectos de la simbiosis MA sobre el crecimiento.....	23
2.2.5.- Análisis estadístico de los datos	23
2.3.- Resultados.....	24
2.3.1.- Caracterización morfológica y arquitectural de <i>F. campestris</i> y <i>F. oolepis</i>	24
2.3.2.- Endomorfología	30
2.3.2.1.- Endomorfología de órganos vegetativos y reproductivos de <i>F. campestris</i> y <i>F. oolepis</i>	30
2.3.2.2.- Cuantificación de tricomas glandulares, conductos resiníferos en las distintas estructuras y naturaleza de las sustancias secretadas.	38
2.3.3.- Micorrizas Arbusculares (MA).....	39
2.3.3.1.- Detección y caracterización de MA en <i>F. campestris</i> y <i>F. oolepis</i>	39

2.3.3.2.- Efecto de la simbiosis MA sobre el crecimiento de <i>F. oolepis</i>	41
2.3.3.3.- Efecto de la simbiosis MA sobre el crecimiento de <i>F. campestris</i>	42
2.4.- Discusión	44
2.4.- Conclusión.....	49
CAPÍTULO 3.....	50
Adaptaciones funcionales en <i>F. campestris</i> y <i>F. oolepis</i> que les facilitan su persistencia en ambientes naturales.....	50
3.1.- Introducción	51
3.2.- Materiales y métodos.	54
3.2.1.- Material Vegetal	54
3.2.1.1 Área de Muestreo	54
3.2.1.2 Muestreo, procesamiento y almacenaje.....	54
3.2.3. Determinación del crecimiento y asignación de recursos en módulos vegetativos y reproductivos.....	55
3.2.4.- Determinación de los requerimientos para la germinación y viabilidad de semillas. ...	56
3.2.5.- Datos climáticos: temperatura y precipitaciones (INA-CIRSA).....	56
3.2.6.- Análisis estadístico de los datos.....	57
3.3.- Resultados	58
3.3.1.- Crecimiento y asignación de recursos en los módulos vegetativos y reproductivos.....	58
3.3.2.- Determinación de los requerimientos para la germinación de semillas (luz y temperatura).	61
3.4.- Discusión	63
CAPÍTULO 4.....	67
Efectos fitotóxicos de extractos acuosos y aceites esenciales de <i>Flourensia campestris</i> y <i>Flourensia oolepis</i>.....	67
4.1.- Introducción	68
4.2.- Materiales y Métodos.....	69
4.2.1.- Material vegetal	69
4.2.1.1 Área de Muestreo	69
4.2.1.2 Muestreo	69
4.2.1.3.- Secado y almacenamiento.....	70
4.2.2.- Bioactividad de extractos acuosos.	70
4.2.2.1.- Extractos acuosos.....	70
4.2.2.2.- Bioensayos	70
4.2.2.3 Partición de los EAq:.....	70
4.2.2.4.- Cálculo y expresión de los resultados:	70
4.2.3.- Bioactividad de los aceites esenciales.....	71
4.2.3.1.- Extracción de los aceites esenciales.....	71
4.2.3.2.- Bioensayos	71
4.2.4.- Análisis estadístico de los datos.....	71
4.3.- Resultados	72
4.3.1.- Bioactividad de EAq de <i>F. campestris</i>	72
4.3.2.- Bioactividad de la fase apolar (EAc) de la partición de EAq de <i>F. campestris</i> con EtOAc.....	74
4.3.3.- Bioactividad de EAq de <i>F. oolepis</i>	76
4.3.4.- Bioactividad de la fase apolar (EAc) de la partición de EAq de <i>F. oolepis</i> con EtOAc	79
4.3.5.- Bioactividad de los aceites esenciales de <i>F. campestris</i>	80
4.3.6.- Bioactividad de los aceites esenciales de <i>F. oolepis</i>	81
4.3.7.- Caracterización fisicoquímica de los EAq de <i>F. campestris</i> y <i>F. oolepis</i>	82
4.4.- Discusión	82
4.5.- Conclusiones	86

CAPÍTULO 5.....	87
Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica en <i>F. campestris</i> y <i>F. oolepis</i>.....	87
5.1.- Introducción	88
5.2.- Materiales y métodos.....	91
5.2.1.- Material Vegetal	91
5.2.1.1 Área de Muestreo.....	91
5.2.1.2 Muestreo.....	91
5.2.2.- Aislamiento y caracterización del metabolito secundario fitotóxico en extractos acuosos de hojas de <i>F. campestris</i>	91
5.2.2.1 Fraccionamiento biodirigido	91
5.2.2.2.- Elucidación estructural del compuesto bioactivo	92
5.2.3.- Cuantificación del compuesto bioactivo por GC-FID y TLC-2D.	92
5.2.3.1.- Preparación de las muestras.....	92
5.2.3.2.- Cuantificación.....	92
5.2.4.- Caracterización de compuestos volátiles en hojas de <i>F. campestris</i> y <i>F. oolepis</i>	93
5.2.4.1.- Extracción.....	93
5.2.4.2.- Identificación	93
5.3.- Resultados.....	94
5.3.1.- Aislamiento y caracterización del metabolito secundario fitotóxico en extractos acuosos de hoja de <i>Flourensia campestris</i>	94
5.3.1.1.- Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa	103
5.3.1.2.- Espectroscopía Infrarrojo (IR)	104
5.3.2.- Actividad fitotóxica del (-)-ácido hamanásico A puro.	105
5.3.3.- Cuantificación del (-)AHA	106
5.3.4.- Determinación de los compuestos volátiles.....	108
5.4.- Discusión.....	110
5.5.- Conclusiones.....	115
CAPÍTULO 6.....	117
Discusión general.....	117
6.1. Principales resultados y discusión.	118
6.1.1.- Adaptaciones morfológicas y anatómicas involucradas en la persistencia de <i>Flourensia campestris</i> y <i>Flourensia oolepis</i> en ambientes naturales.	118
6.1.2.- Adaptaciones funcionales en <i>F. campestris</i> y <i>F. oolepis</i> que les facilitan su persistencia en ambientes naturales.	120
6.1.3.- Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica en <i>F. campestris</i> y <i>F. oolepis</i>	122
6.2. Conclusiones.....	125
BIBLIOGRAFÍA	127
APÉNDICE I	143

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Densidad de tricomas glandulares en hojas vegetativas, en brácteas y flores en <i>F. campestris</i> y <i>F. oolepis</i> . Los datos corresponden a la media \pm ES; recuentos realizados en 30 campos de 1 mm ² . Diferencias significativas entre hojas vegetativas (*), entre brácteas y flores (®) y entre especies (a, b).....	38
Tabla 2.2. Densidad y diámetro de los canales resiníferos en corte transversal de órganos caulinareos vegetativos y reproductivos. Se incluye el cálculo de la superficie total ocupada por los canales en secciones de 1 mm ² . El cálculo de la superficie de cada conducto se aproximó a la del círculo. Los datos representan las medias \pm ES (n = 30). Diferencias significativas entre órganos (*) y entre especies (a, b, c y d) - p< 0,05.....	39
Tabla 2.3. Porcentaje de colonización MA, hifas, vesículas y arbuscúlos, en <i>F. oolepis</i> y en <i>F. campestris</i>	41
Tabla 2.4 Longitud de tallo y raíz, y diámetro a la base del tallo en plantas juveniles de <i>F. oolepis</i> crecidas sin y con inóculo micorrícico. Los valores representan la media \pm ES de tres ensayos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas, p< 0,05.	42
Tabla 3. 1. Tiempo medio de germinación (TMG) y germinación relativa a la luz (GRL) bajo los dos regímenes de temperatura, para ambas especies. Los valores expresan la media \pm 1 ES.	62
Tabla 4.1. Bioactividad de los distintos extractos acuosos de <i>F. campestris</i> sobre la germinación y el crecimiento de <i>Lactuca sativa</i> . EAq, extracto acuoso; EAc, fase apolar de la partición de EAq con EtOAc; G, germinación; VE, velocidad de emergencia o vigor germinativo; LT, longitud de tallo; LR, longitud de raíz; (-), sin efecto; ($\downarrow\downarrow$), marcada disminuci3n; (\downarrow), disminuci3n; (\uparrow), aumento.....	73
Tabla 4.2. Bioactividad de los extractos acuosos de <i>F. oolepis</i> sobre la germinaci3n y el crecimiento de <i>L. sativa</i> . EAq, extracto acuoso; EAc, fase apolar de la partici3n de EAq con EtOAc; G, germinaci3n; VE, velocidad de emergencia o vigor germinativo; LT, longitud de tallo; LR, longitud de ra3z; (-), sin efecto; ($\downarrow\downarrow$), marcada disminuci3n; (\downarrow), disminuci3n; (\uparrow), aumento; (*), diferencias significativas de cada tratamiento vs. control (p < 0,001).....	76
Tabla 4.3: Caracterizaci3n fisicoquímica de los extractos acuosos de <i>Flourensia campestris</i> (FC) y <i>Flourensia oolepis</i> (FO). Valores medios hallados entre dos extractos de cada 3rgano. ND: no determinado	82
Tabla 5.1 Corrimiento químico (δ), multiplicidad, integraci3n, constantes de acoplamiento (<i>J</i>) y asignaci3n de los hidrógenos del (-)-ácido hamanásico A.	95
Tabla 5.2 Correlaciones COSY 1H-1H de hidrógenos del (-)-ácido hamanásico A.	96
Tabla 5.3 Correlaciones COSY 1H-1H de hidrógenos 5 b, 9, 4, 3 b, 6 a y 6 b del (-)-ácido hamanásico A.	97
Tabla 5.4 Correlaciones HSQC ¹ H- ¹³ C y DEPT 135 del (-)-ácido hamanásico A.	100
Tabla 5.5 Corrimiento químico y asignaci3n de núcleos en la estructura molecular del (-)-ácido hamanásico A.	101
Tabla 5.6 Correlaciones HMBC del (-)-ácido hamanásico A.....	102
Tabla 5.7 Datos de IR de la molécula del (-)-ácido hamanásico A.	104
Tabla 5.8. Concentraci3n de (-)AHA en diferentes 3rganos y poblaciones de <i>F. campestris</i> y <i>F. oolepis</i> . Medias \pm ES, a partir de dos experimentos independientes con tres ensayos para cada determinaci3n (n = 6). Los asteriscos representan diferencias significativas entre las hojas secas y frescas (p <0,05).....	107

Tabla 5.9. Concentración de (-)AHA en extractos acuosos de hojas de *F. campestris*. Medias \pm ES, a partir de dos experimentos independientes con tres ensayos para cada determinación (n = 6). Los asteriscos representan diferencias significativas entre las hojas secas y frescas (p <0,05). 107

Tabla 5.10. Composición de volátiles de hojas secas de *F. campestris* y *F. oolepis* recolectadas en diferentes estaciones. Los compuestos son listados en orden de elusión. Todos los compuestos fueron identificados por GC (comparación con el índice de retención bibliográfico) y MS (identificación en base a la comparación de espectros de masa). Los nombres de los compuestos se hallan en inglés para facilitar su identificación..... 109

Tabla I.1. Análisis físico-químicos de los suelos de “Río Pintos”, camino a “Los Terrones”, frente al dique “El Cajón” y “El Dragón” (Depto. Punilla, Córdoba). 143

Tabla I.2. Textura de los suelos de “Río Pintos”, “El Dragón”, camino a “Los Terrones” y frente al dique “El Cajón” (Depto. Punilla, Córdoba)..... 144

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1.** *Flourensia campestris* (Dillon 1984); A, rama florífera; B, capítulo; C, flor del disco 9
- Figura 1.2.** *Flourensia oolepis* (Ariza Espinar 2801 -CORD-). A: capítulos, x 1,5; B: flor tubulosa hermafrodita, x 5; C: rama florífera, 0,5; D: pétalos, x 6; E: corola de flor ligulada, x 3; F: ramas estigmáticas, x 15; G: brácteas del involucre, x 5; H: estambres, x15. Dibujo J. De Ugarte. 10
- Figura 1.3.** Ubicación del Valle de Punilla, Córdoba Argentina. Imagen satelital Google Earth. Poblaciones estudiadas de *F.campestris* y *F.oolepis*. 12
- Figura 1.4.** Áreas de muestreo: “El Dragón”, *Flourensia campestris*; frente al Dique “El Cajón”, *Flourensia oolepis*. 13
- Figura 1.5.** Áreas de muestreo: “Pintos”, *Flourensia campestris*; camino a “Los Terrones”, *Flourensia oolepis*. 13
- Figura 2.1** Plantas juveniles con raíz e hipocótilo contráctiles de *F. campestris* (A-B) y de *F. oolepis* (C-D). 25
- Figura 2.2.** Xilopodio. A: *F. campestris*, se observan las reiteraciones, producidas por las yemas adventicias de la sección caulinar del xilopodio de individuos adultos. B: corte longitudinal del xilopodio de *F. oolepis*, en el que se visualizan las dos secciones que lo forman (caulinar y radical). C: Individuo juvenil de *F. campestris*, se visualiza el inicio del xilopodio a partir del nudo cotiledonar (nc), incluye engrosamiento del hipocótilo y de la porción proximal de la raíz. Escala: A-C 10 cm. 26
- Figura 2.3.** Representación esquemática de la arquitectura de *F. campestris* y *F. oolepis*. Ambas especies presentan un vástago aéreo de crecimiento continuo definido, con ramificación simpodial y difusa. La fotografía se corresponde con la panícula de capítulos representada en el esquema. 27
- Figura 2.4.** Inflorescencias. A. *F. oolepis*: detalle de la porción distal de la panícula, nótese el desarrollo del capítulo apical, el primero en florecer; B. *F. campestris*: panículas de capítulos terminales y axilares. Escala: A-B: 2,3 cm. 28
- Figura 2.5.** Inflorescencias. A: *F. campestris*: panículas de 5 a 15 capítulos; B: *F. oolepis*: panículas con 2-3 capítulos. Escala: A-B: 2,3 cm. 29
- Figura 2.6.** Fotomicrografías con microscopio Wild M20. A: Corte transversal de hoja (*F. campestris*) se observa: una cutícula delgada, epidermis foliar unistrata con típicas células epidérmicas, gtr: tricoma glandular (peltado); d: ducto o canal resinífero; sch: cámara subestomática; vb: haz vascular. B: tricoma glandular con 3 células basales, pie bicelular biseriado y cabezuela pluricelular biseriada formada generalmente por 6 a 8 células. Escala: A (27,5 µm); B (2 µm). 31
- Figura 2.7.** Fotomicrografías de hoja (MEB). A: epidermis, cara abaxial de *F. oolepis*, se observan los tricomas glandulares -gtr- y tricomas eglandulados -tr-, distribuidos sobre los nervios con mayor densidad; st: estomas sobre-elevados. B: *F. oolepis*: cabeza del tricoma glandular con cutícula sana, las sustancias producidas atraviesan la laxa cutícula hacia el exterior sin presencia poros. C: epidermis, cara abaxial de *F. campestris*, se observa la disposición de los tricomas. D: *F. campestris*: cabeza del tricoma, se observa la cutícula rasgada por donde son excretadas las sustancias. Las flechas indican el sector donde se produce el poro para la salida de la secreción. Escala: A (10 µm); B (3 µm); C (30 µm); D (10 µm). 32
- Figura 2.8.** Fotomicrografías de la ultraestructura celular del tricoma glandular de una hoja de *F. oolepis* y *F. campestris* (MET). A: *F. oolepis*: se observa el citoplasma electrodens con la presencia de mitocondrias -m-, pared celular -cw- con una capa exterior -x- pectocelulósica con microfibrillas de celulosa laxas y cutícula -c- gruesa. B: *F. oolepis*: se indica con flecha el

recorrido de las sustancias lipofílicas atravesando la pared celular hasta la cámara subcuticular donde se acumula -s-. Las sustancias son liberadas al exterior a través de la laxa cutícula exterior sin presentar poros. C: *F. campestris*: se puede observar claramente en la pared celular -cw- y la secreción acumulada -s- en los nuevos espacios intrafibrilares. D: *F. campestris*: las flechas señalan las vesículas lipofílicas acumuladas transitoriamente en la pared; estas sustancias son almacenadas en la cámara subcuticular y posteriormente liberadas al exterior con ruptura de la cutícula (poro). E: *F. campestris*: vista del contenido celular de las células del pie en la que se observan abundantes dictiosomas -d-. F: *F. oolepis*: detalle del retículo endoplasmático rugoso -ER- próximo a la pared celular -cw- y vacuolas con glóbulos lipídicos -lg-. G: *F. campestris*: detalle de un cloroplasto con gránulos de almidón. Escalas: A (200 nm); B (100 nm); C (200 nm); D (100 nm); E (200 nm); F (500 nm); G (200 nm)..... 33

Figura 2.9. Fotomicrografías de los canales resiníferos en hojas de *F. campestris* y *F. oolepis* (MET). A: *F. campestris*: detalle de las células epiteliales hacia el interior del conducto. Se observan numerosas vacuolas lipídicas -v-, las cuales se encuentran en contacto con la pared tangencial externa muy invaginada, y un gran núcleo -n-. También se observan células subepiteliales con vacuolas lipídicas y pared suavemente invaginada. B: *F. oolepis*, detalle del contenido de las células epiteliales, n: núcleo; m: mitocondria; ER: retículo endoplasmático rugoso; cw: pared celular. Hacia el interior del ducto (lumen), la pared celular aparece degradada. Escalas: A (1 µm); B (200 nm)..... 34

Figura 2.10. Fotomicrografía de cortes transversales de tallo primario (MO). A: *F. oolepis*, se observan los tricomas glandulares y la secreción, algunas capas de colénquima (tejido de sostén) y los canales juveniles en la corteza -d- próximos a los haces vasculares. B: *F. campestris*, tallo primario con tricomas glandulares -gtr-. C: *F. campestris* con inicio de crecimiento secundario, se observan los casquetes de fibras más conspicuos en la zona del protofloema y la vaina parenquimática -v-. En la médula, próximos al xilema y en la corteza, se observan canales -d-. D: *F. campestris*, material fotografiado con microscopio de fluorescencia (UV), se observa la autofluorescencia de los tricomas y de la hipodermis (2-3 capas de células). Vaina parenquimática -v-. Escalas: A (40 µm); B (55 µm); C (110 µm); D (75 µm). 35

Figura 2.11. Fotomicrografías de secciones transversales de tallo secundario con tres períodos de crecimiento. *F. oolepis* (MO). A: canales resiníferos -d- distribuidos en la corteza próximos a los casquetes de fibras del protofloema. Los conductos más internos, en el floema secundario, son producto de la actividad cambial. B: detalle de los conductos -d- próximos al protoxilema (que quedan en la porción interna del tallo). En su interior se observan las resinas producidas, adosadas al epitelio. C: detalle de los ductos -d- próximos a los radios floemáticos -phr-. Escalas= A (115 µm), B (76 µm), C (37 µm). 36

Figura 2.12. Fotomicrografía del corte transversal de raíz con inicio de crecimiento secundario en *F. campestris* (MO). A: detalle del desarrollo inicial de los canales resiníferos -d- próximos y externos a la endodermis (las flechas indican la posición de la endodermis). Se observa la presencia de súber -s- formado en la zona más externa, poco común en raíces. B: detalle de un ducto -d- con una gota de resina -rd- en su interior. Escalas= A (110 µm), B (75 µm)..... 37

Figura 2.13. Fotomicrografía de órganos reproductivos (MO). A: *F. oolepis*. Corte longitudinal del capítulo donde se observa una filaria -ph-, tricomas glandulares -gtr- y canales -d- nótese la abundancia de tricomas glandulares en ambas epidermis de la filaria y también en la corola de una flor tubulosa. B: *F. campestris*, sección transversal de la base del capítulo donde se muestra la presencia de ductos -d- próximos al haz vascular -vb-. Escalas= A (37 µm), B (75 µm)..... 37

Figura 2.14. Microfotografías en las que se muestra la colonización de raíces de *F. oolepis* por Micorrizas Arbuscular (MA) y "Endofitos Septados Oscuros" (DSE -Dark Septate Endophytes-), (tinción con Azul de Tripan). A: hifas de MA de distinto grosor (flecha blanca) e hifas de DSE (flecha amarilla); B: detalle de hifas de MA intra e intercelulares (flecha blanca) y de los DSE - hifas castañas (flecha amarilla)- con formación de microesclereocios; C: detalle de una vesícula; D: Detalle de un rulo..... 40

Figura 2.15. Microfotografías en las que se muestra la colonización de raíces de <i>F. campestris</i> por Micorrizas Arbuscular (MA) (tinción con Azul de Tripan). A: hifas de MA de distinto grosor (flecha blanca); B: detalle de hifas intra e intercelulares y de vesícula (flecha) de MA; C: detalle de un rulo; D: detalle de una vesícula.....	41
Figura 2.16. Efecto de la simbiosis MA sobre el crecimiento de <i>F. oolepis</i> . A: Longitud de tallo y de raíz (cm); B: detalle de la raíz de una plántula sin micorrizar; C: detalle de la raíz de una plántula micorrizada. Con MA: plántulas crecidas con inóculo micorrízico arbuscular. Sin MA: plántulas crecidas sin inóculo micorrízico arbuscular.....	43
Figura 2.17. Efecto de la simbiosis MA sobre el crecimiento de <i>F. oolepis</i> . Las barras representan el peso seco (g) de las distintas fracciones (hoja, tallo y raíz) y la biomasa total por planta en ambos tratamientos. Se representa la media de tres ensayos independientes \pm ES. (*), diferencias significativas, $p < 0,05$. SM: Plántulas crecidas sin inóculo micorrízico arbuscular.	44
Figura 3.1. Representación esquemática de módulos reproductivos (1) y vegetativos (2) de <i>F. campestris</i> y <i>F. oolepis</i> . TRn: Tallo reproductivo crecimiento del año. TRv: Tallo reproductivo crecimiento del año anterior. TVn: Tallo vegetativo crecimiento del año. TVv: Tallo vegetativo crecimiento del año anterior.....	55
Figura 3.2. Precipitación acumulada anual para el período 2000 – 2009 “Estación Meteorológica Villa Giardino” Valle de Punilla, Córdoba. Datos otorgados por INA-CIRSA Instituto Nacional del Agua – Centro de la Región Semiárida, Sede Carlos Paz.....	57
Figura 3.3. Precipitación acumulada mensual de los meses correspondientes a la floración y llenado de semillas para el período 2003-2005 (A) y 2007-2009 (B).....	57
Figura 3.4. Distribución de la biomasa total producida durante la estación de crecimiento en los módulos vegetativos (MV) y los módulos reproductivos (MR), para cada uno de los años evaluados. A: <i>F. campestris</i> , B: <i>F. oolepis</i> . ER: estructuras reproductivas (receptáculo + pedúnculo).....	58
Figura 3.5. <i>F. campestris</i> . Relación entre la biomasa total producida por cada módulo durante la estación de crecimiento y la biomasa de las distintas fracciones que lo componen, para cada uno de los años estudiados. A: año 2008 MV, B: año 2009 MV. C: año 2008 MR, D: año 2009 MR. MV: Módulo vegetativo, MR: Módulo reproductivo, ER: estructuras reproductivas (receptáculo + pedúnculo).....	60
Figura 3.6. <i>F. oolepis</i> . Relación entre la biomasa total producida por cada módulo durante la estación de crecimiento y la biomasa de las distintas fracciones que lo componen, para cada uno de los años estudiados. A: año 2004 MV, B: año 2005 MV. C: año 2004 MR, D: año 2005 MR. MV: Módulo vegetativo, MR: Módulo reproductivo, ER: estructuras reproductivas (receptáculo + pedúnculo).....	61
Figura 3.7. Determinación de los requerimientos de luz y temperatura para la germinación de semillas de <i>F. campestris</i> y <i>F. oolepis</i> . Dinámica de la germinación para semillas incubadas bajo dos regímenes de temperatura, constante (20 °C) y alternada (25 /10 °C).....	62
Figura 4.1. Bioactividad de extractos acuosos de hoja (A), flor (B), raíz (C) y semilla (D) de <i>F. campestris</i> sobre la germinación y el crecimiento de raíz y tallo de <i>L. sativa</i> a las 72 h. Los puntos representan medias entre bioensayos independientes (n=3). (*), (**); diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente).	73
Figura 4.2. Bioactividad de las distintas concentraciones de los extractos acuosos de hoja (A), flor (B), raíz (C) y semillas (D) de <i>F. campestris</i> sobre la germinación <i>L. sativa</i> . Germinación acumulada por 72 h de tratamiento. (*), diferencias significativas respecto al control ($p < 0,01$).	74
Figura 4.3. Bioactividad de las distintas concentraciones de los EAc de hojas de <i>F. campestris</i> sobre la germinación y el crecimiento de raíz y tallo de <i>L. sativa</i> a las 72 h. Los	

puntos representan las medias de 3 bioensayos independientes. (*) y (**) indican diferencias significativas con el control ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente).	75
Figura 4.4. Efecto de las distintas concentraciones de los EAc de hoja de <i>F. campestris</i> sobre la germinación de <i>L. sativa</i> . Germinación acumulada por 72 h de tratamiento. (*) indica diferencias significativas con el control ($p < 0,01$).	75
Figura 4.5. Bioactividad de las distintas concentraciones de los extractos acuosos de hojas (A), flores (B) y raíces (C) de <i>F. oolepis</i> sobre la germinación y el crecimiento de raíz y tallo de <i>L. sativa</i> . Los puntos representan medias entre bioensayos independientes ($n=3$). (*) y (**) indica diferencias significativas con el control ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente).	77
Figura 4.6. Bioactividad de los extractos acuosos de hoja (A), flor (B), raíz (C) de <i>F. oolepis</i> sobre la germinación <i>L. sativa</i> . Germinación acumulada por 72 h de tratamiento. (*) indican diferencias significativas respecto al control ($p < 0,01$).	78
Figura 4.7. Bioactividad de las distintas concentraciones de los EAc de hoja de <i>F. oolepis</i> sobre la germinación y el crecimiento de raíz y tallo de <i>L. sativa</i> . Los puntos representan medias entre bioensayos independientes ($n=3$). (*) indican diferencias significativas con el control ($p < 0,01$).	79
Figura 4.8. Efecto de las distintas concentraciones de los EAc de hojas de <i>F. oolepis</i> sobre la germinación de <i>L. sativa</i> . Germinación acumulada por 72 h de tratamiento. (*) indica diferencias significativas con el control ($p < 0,01$).	80
Figura 4.9. Bioactividad de las distintas concentraciones de los aceites esenciales de hoja de <i>F. campestris</i> sobre la germinación y el crecimiento de raíz y tallo de <i>L. sativa</i> . Los puntos representan medias entre bioensayos independientes ($n=3$). Las concentraciones de 0,5 a 1,5 $\mu\text{l ml}^{-1}$ se corresponden con 500 a 1500 ppm; (*) indican diferencias significativas con el control ($p < 0,01$).	80
Figura 4.10. Efecto de las distintas concentraciones de los aceites esenciales de hoja de <i>F. campestris</i> sobre la germinación <i>L. sativa</i> . Germinación acumulada por 72 h de tratamiento. Las concentraciones de 0,5 a 1,5 $\mu\text{l ml}^{-1}$ se corresponden con 500 a 1500 ppm; (*) indican dferencias significativas con el control ($p < 0,01$).	81
Figura 4.11. Bioactividad de los aceites esenciales de hoja de <i>F. oolepis</i> sobre la germinación y el crecimiento de raíz y tallo de <i>L. sativa</i> . Los puntos representan medias entre bioensayos independientes ($n=3$). Las concentraciones de 0,5 a 1,5 $\mu\text{l ml}^{-1}$ se corresponden con 500 a 1500 ppm; (*), diferencias significativas con el control ($p < 0,01$).	81
Figura 4.12. Efecto de las distintas concentraciones de los aceites esenciales de hoja de <i>F. oolepis</i> sobre la germinación acumulada de <i>L. sativa</i> . Las concentraciones de 0,5 a 1,5 $\mu\text{l ml}^{-1}$ se corresponden con 500 a 1500 ppm; (*), diferencias significativas respecto al control ($p < 0,01$).	82
Figura 5.1. Estructura química del (-)-ácido hamanásico A.	94
Figura 5.2. Fragmento 3,3-dimetil alilo.	95
Figura 5.3. Fragmento de anillo ciclo hexeno.	98
Figura 5.4. HMBC, correlaciones más relevantes del (-)-ácido hamanásico A.	103
Figura 5.5. Efecto del ácido (-)-hamanásico A sobre la germinación, y el crecimiento de raíz y tallo de <i>L. sativa</i> . Los puntos representan las medias entre tres bioensayos independientes. (*), (**); diferencias significativas con respecto al control $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente....	106
Figura 5.6. TLC-2D. Se observa la identificación y semi-cuantificación de (-)-ácido hamanásico A (a) y una muestra de la fase apolar del extracto acuoso de hojas de <i>F. campestris</i> particionado con EtOAc (b), teñido con vapores de I_2 . Flecha cortada y flecha completa indican el recorrido en primera y segunda dimensión, respectivamente. El compuesto bioactivo se indica con las flechas diagonales.	107

Figura 5.7. TLC-2D de (-)AHA y aceites esenciales (1:200) de *F. campestris* (a) y *F. oolepis* (b). En ninguno de los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación se pudo identificar la presencia de (-)AHA. 108

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 5.1. Señales de ^1H -RMN del (-)-ácido hamanásico A.....	95
Espectro 5.2. Señales de COSY ^1H - ^1H del (-)-ácido hamanásico A. Se resaltan las principales correlaciones de los hidrógenos vinílicos 2 y 12.....	96
Espectro 5.3. Señales de COSY ^1H - ^1H ampliadas del (-)-ácido hamanásico A. Se resaltan las correlaciones de los hidrógenos 5 b, 9, 4, 3 b, 6 b, 6 a.....	97
Espectro 5.4. Señales de HSQC ^1H - ^{13}C unidos directamente en la estructura molecular del (-)-ácido hamanásico A.	99
Espectro 5.5. Señales de HSQC ^1H - ^{13}C ampliadas del (-)-ácido hamanásico A.....	99
Espectro 5.6. DEPT 135 del (-)-ácido hamanásico A.	100
Espectro 5.7. ^{13}C del (-)-ácido hamanásico A.....	101
Espectro 5.8. Señales de HMBC del (-)-ácido hamanásico A	102
Espectro 5.9. A: Cromatograma del (-)-ácido hamanásico A. B: Espectro de masas del (-)-ácido hamanásico A.....	103
Espectro 5.10. Espectro de infrarrojo del (-)-ácido hamanásico A.	104

Características y mecanismos funcionales involucrados en la ecofisiología de *Flourensia campestris* y *F. oolepis* (Asteraceae).

Resumen

Flourensia campestris (FC) y *F. oolepis* (FO), son arbustos nativos que crecen en zonas áridas de Córdoba, formando comunidades (“chilcales”) de alto valor ecológico en estos ecosistemas. Estos ambientes se hallan expuestos a diversos factores de estrés abiótico a los que las plantas se han adaptado. Esta tesis se centró en dilucidar adaptaciones morfológicas y funcionales claves que les permitan a estas especies crecer y persistir en su ambiente natural. Los estudios arquitecturales, y exo- y endomorfológicos demostraron que ambas especies comparten características xeromórficas, lo cual les confiere ventajas adaptativas. Asimismo, la presencia de Micorrizas Arbusculares (MA) y Septados Oscuros (DSE) podría aumentar la competitividad de estas especies.

FC y FO mostraron plasticidad en relación a su respuesta frente a variaciones en las condiciones ambientales entre ciclos de crecimiento. Las relaciones entre la biomasa total producida por cada tipo de módulo (vegetativo y reproductivo) y la biomasa en hojas resultó positiva y significativa. El número de hojas, y el número y tamaño de las semillas fueron las variables más afectadas. La germinación está controlada por la temperatura, y la viabilidad de las semillas se relacionó con las condiciones ambientales en las que se produjeron. La viabilidad se mantuvo relativamente constante durante un año, disminuyendo luego en forma abrupta, lo cual sugiere que a campo el banco de semillas dependería de los aportes continuos de la reproducción sexual.

Los extractos acuosos de hojas de FC poseen un potente efecto inhibitorio sobre la germinación y el crecimiento de *Lactuca sativa*, mientras que los de FO sólo afectaron el crecimiento de tallo y raíz. Mediante fraccionamiento cromatográfico bio-guiado y técnicas espectrales se aisló e identificó el (-)-ácido hamanásico A ((-)-AHA), como el principal metabolito responsable del efecto fitotóxico, siendo este trabajo el primero en reportar la actividad fitotóxica de (-)-AHA y su presencia en FC. En FO el (-)-AHA se encuentra en muy bajas concentraciones. En ambas especies, las características descriptas, les otorgarían ventajas adaptativas para su supervivencia, aumentando la competitividad en las comunidades de las que forman parte.

Palabras claves

Especies nativas y endémicas. Bosque Serrano. Córdoba. *Flourensia campestris*. *Flourensia oolepis*. Adaptaciones. Alelopatía. Metabolitos secundarios. (-)-ácido hamanásico A. Bioactividad. Micorrizas. Factores de estrés ambiental.

Life traits and functional mechanisms involved in the ecophysiology of *Flourensia campestris* and *F. oolepis* (Asteraceae).

Abstract

Flourensia campestris (FC) y *F. oolepis* (FO) are native shrubs that grow in arid areas of Córdoba, forming communities (“chilcales”) of great ecological value. In these environments, characterized by abiotic stresses, these species have evolved adaptive strategies that allow their growth and survival. This thesis has focused on the elucidation of morphological and functional adaptations that may be key for the persistence of these species in their natural environments. Architectural and exo and endomorphological studies showed that both species share xeromorphic attributes that confer adaptive advantages. The simultaneous association of FC and FO with MA and DSE would increase their competitive ability with neighboring species.

FC y FO exhibited a high plasticity in response to inter-annual variations in the environmental conditions prevalent during the growth cycle. The relationship between the total biomass produced by each type of module (vegetative and reproductive) during the growing season and the biomass allocated to leaf production were positive and robust. The number of leaves, the number of seeds and individual seed size were the variables most affected.

Germination is controlled by temperature and seed viability depended on the environmental conditions that prevailed during seed growth. Viability remained fairly constant during one year and diminished abruptly thereafter, suggesting that the maintenance of seed banks would depend on yearly inputs through reproduction.

Leaf water extracts of FC showed a strong inhibitory effect on seed germination and growth of *L. sativa*; those of FO only affected root and hypocotile growth. A combination of bio-guided chromatographic fractionation and spectral techniques allowed us to isolate and identify (-)-hamanasic acid A ((-)-AHA), as the principal metabolite responsible of the phytotoxic effects; this work is the first to report on the phytotoxicity of (-)-AHA and its presence in FC. (-)-AHA concentrations were low in FO. All the traits described in the present work would confer these species with adaptive strategies that allow them to survive, increasing their competitive ability in the communities in which they grow.

Key words

Native and endemic species. Bosque Serrano. Córdoba. *Flourensia campestris*. *Flourensia oolepis*. Adaptive traits. Allelopathy. Secondary metabolites. (-)-hamanasic acid A. Bioactivity. Mycorrhiza. Environmental stress.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

En el ambiente convergen e interactúan diversos tipos de factores bióticos (flora y fauna) y abióticos (suelo, agua, clima, entre otros). La combinación e interacción de los mismos en los sistemas naturales, influye sobre la vegetación a tal punto que la convierten en un indicador irremplazable de calidad de cada ambiente.

Las condiciones naturales como la disponibilidad de agua, el suministro de nutrientes, la intensidad de la radiación y la temperatura rara vez son óptimas para el crecimiento vegetal. A estos patrones ambientales se suman las actividades del hombre en cuanto al uso y al manejo de los recursos naturales, la ganadería, la tala y los incendios, que afectan directamente las poblaciones naturales. El estudio de los mecanismos involucrados en las respuestas de las plantas a estas variables resulta importante para entender, a escala regional, los patrones de distribución de las distintas especies en el espacio geográfico; lo cual proporciona información útil y confiable para el aprovechamiento racional de los recursos naturales (Cabido y Zak 1999).

1.1.- Situación actual y estado del conocimiento sobre las especies nativas.

La zona centro de Argentina, especialmente la provincia de Córdoba, se caracteriza por poseer una elevada riqueza de especies nativas y endémicas, con potencial valor medicinal y agroindustrial. En las últimas décadas la presión sobre las poblaciones naturales (en especial en aquellas con áreas de distribución restringidas) se ha incrementado drásticamente debido, por un lado, a la recolección indiscriminada y, fundamentalmente, a los incendios periódicos, que provocan desequilibrios ecológicos no solo sobre la flora y la fauna sino también sobre el balance hídrico y el suelo (Nuñez y Cantero 2000, Dennis et al. 2001). A esto debemos sumarle las características propias del gradiente ambiental en el que habitan, estando expuestas a diversos factores de estrés abiótico como la sequía, la baja disponibilidad de nutrientes y la exposición a elevados niveles de radiación y UV-B. Las plantas además están sujetas a otras interacciones que influyen su diseminación, como la herbivoría, el ataque de hongos, virus y bacterias, entre otros. Frente a todos estos factores, las especies nativas han desarrollado un elenco de respuestas adaptativas que les resultan vitales. En estos casos las adaptaciones morfológicas y fisiológicas, la producción constitutiva o inducida de metabolitos secundarios, así como el sistema de reproducción predominante, resultan claves para su supervivencia, pudiendo tener incluso un impacto importante a nivel del ecosistema (Cipollini 2004).

En la zona serrana de Córdoba, en los Departamentos de Punilla y San Alberto, son abundantes las poblaciones de *Flourensia spp*, *Baccharis spp*, *Achyrocline spp*, *Trichocline spp*, *Aloysia spp*, *Acantholippia spp*, *Buddleja spp* y *Sophora linearifolia*, las cuales presentan un alto valor como fuentes de resinas, principios aromáticos y medicinales (Amorín y Rosow 1989/90/91/92). La mayor parte de la información se refiere a estudios taxonómicos y descripciones botánicas (Barboza et al. 2001), identificación de compuestos químicos y en algunos casos sus posibles aplicaciones en la industria o uso tradicional (e.g., Amorín y Rosow 1989, 1992, Zygadlo et al. 1996, Desmachelier et al. 1998, Juliani et al. 2002, Scrivanti et al. 2003, Barboza et al. 2006).

A pesar de la potencial importancia económica y del reconocimiento local por los problemas de conservación que enfrentan, solo existen escasos estudios que puedan ser aplicados para el diseño de estrategias de conservación *in situ* y *ex situ*. Del mismo modo, los estudios que relacionan la regulación de la producción de los principios activos (calidad y cantidad) como respuesta a factores ambientales, y la importancia de estos compuestos en el mantenimiento de las poblaciones naturales, son muy reducidos.

Este es el caso de *F. campestris* y *F. oolepis* (nombre vulgar: chilca), dos arbustos nativos, el primero de ellos endémico, que en el Bosque Serrano de Córdoba constituyen comunidades casi puras denominadas "chilcales" (Luti et al. 1979). Al presente no existen estudios que permitan conocer las estrategias adaptativas que les han posibilitado perpetuarse en un ambiente natural adverso, con suelos pobres en nutrientes (INTA Manfredi 2003) y caracterizado por la incidencia de diversos factores de estrés abióticos, sumado a la variabilidad temporal ocasionada por los disturbios. Ambas especies resultan de gran importancia ecológica como bio-indicadoras de zonas disturbadas por el fuego y por acción antrópica (Tortorelli 1956, Parodi 1964, Ruiz Leal 1972). Son reconocidas por sus usos tradicionales como aromáticas, tintóreas, medicinales y, en especial sus raíces, para leña (Paz 1928, Fernández 1945), y presentan potencial aplicación en la agroindustria como insecticida, antimicrobiana, antifúngica y aleloquímica (Borron y Ibrahim 1996, Tellez et al. 2001, García et al. 2007, Palacios et al. 2007, Díaz Napal et al. 2009, Carpinella et al. 2010). En ambas especies se puede observar su alto contenido de resinas, otra fuente potencial de aplicación industrial (Bohlmann et al. 2008).

Por lo expuesto, resulta necesario enfocar el estudio de las características del ciclo de vida y de las adaptaciones morfológicas y fisiológicas de *F. campestris* y *F. oolepis*, a fin de elaborar pautas para la conservación de las poblaciones naturales y/o para su posible introducción al cultivo. En el mismo sentido, la caracterización e identificación de los metabolitos secundarios, la regulación de su producción como respuesta a condiciones ambientales, y el estudio de sus efectos sobre las interacciones planta-planta, permitirán interpretar el rol que estos principios activos juegan en el mantenimiento de las poblaciones naturales. Este enfoque y sus resultados serán de gran relevancia al constituir un antecedente a partir del cual se aborden los problemas de conservación de otras especies amenazadas del Bosque Serrano.

1.2.- Adaptaciones morfológicas y funcionales de las plantas frente a factores de estrés.

Las plantas han desarrollado un complejo sistema de percepción del ambiente y mecanismos de respuesta que les permiten ajustar su crecimiento y morfología a las condiciones naturales. Las respuestas de las plantas a cambios en los factores ambientales involucran tanto adaptaciones genéticas como aclimatación fenotípica. A su vez, las respuestas pueden estar directamente relacionadas con la escasez de un recurso (controladas por el recurso) o pueden anticiparse a la escasez de éste a través de la percepción de señales específicas, de modo que la planta ajuste su funcionamiento antes que el factor limite otras funciones fisiológicas (Lambers y Poorter 1992).

El crecimiento es ciertamente uno de los procesos más importantes cuando se trata de predecir las respuestas de las plantas al ambiente. Una respuesta generalizada frente a condiciones sub-óptimas o limitantes en algún factor, es la reducción de la tasa de crecimiento por cambios en la distribución de recursos, de forma de minimizar dicha limitación (Chapin et al. 1987). Las variaciones morfológicas o fisiológicas que maximizan la longevidad de la hoja dependerán a su vez del factor ambiental que actúe como limitante. Por ejemplo, en el caso del efecto abrasivo de vientos fuertes, aumenta la inversión en fibras y esclerénquima; la transpiración puede reducirse incrementando la capa límite mediante la generación de pelos, o la deposición de ceras (también confieren resistencia a enfermedades), aumentando la eficiencia en el uso del agua. El tipo de ceras epicuticulares (Steimüller y Tevini 1985, Barnes y Cardoso-Vilhena 1996, Costa et al. 2006), y su configuración, también pueden modificar la capacidad de reflejar radiaciones en las superficies foliares, reduciendo la carga total de energía y de

fotones a los que las hojas están sometidas, contribuyendo a disminuir los daños asociados a altas temperaturas, altos niveles de UV-B y fotoinhibición.

En ecosistemas que presentan alto grado de disturbios o de estrés ambiental, el sistema de reproducción juega un papel fundamental en la perpetuación de las especies. En estos ambientes podemos hallar plantas que dependen exclusivamente de la reproducción sexual y las que lo hacen sólo por vía vegetativa (Moreno y Oechel 1994). En muchas especies, las semillas juegan un rol importante en la recuperación y mantenimiento de las poblaciones naturales, fundamentales en la colonización de nuevas áreas y el mantenimiento de la diversidad genética. En ambientes en los que la floración es infrecuente y los eventos de establecimiento son bajos, la reproducción vegetativa se halla bien desarrollada (Shaver et al. 1979, Chapin et al. 1980).

Actualmente se desconocen los mecanismos de respuesta (cambios en el crecimiento y morfología) que facilitan la persistencia de *F. campestris* y *F. oolepis* en ambientes naturales.

1.3.- Metabolitos secundarios: funciones, importancia y actividad biológica en poblaciones naturales.

Las plantas transforman e inter-convierten un gran número de compuestos orgánicos para vivir, crecer y reproducirse. Para ello poseen una compleja red química que colecta y remite los metabolitos intermedios a las rutas metabólicas adecuadas. Muchos de estos compuestos denominados metabolitos primarios (carbohidratos, proteínas, grasas y ácidos nucleicos) son de crucial importancia para la vida de la planta.

En contraste con los metabolitos primarios, que son sintetizados, degradados e inter-convertidos en todas las especies, existe un grupo de compuestos denominados metabolitos secundarios, cuya distribución se encuentra limitada al reino vegetal, y su síntesis puede ser exclusiva de un género o especie.

Los metabolitos secundarios (terpenos, compuestos fenólicos y nitrogenados) son sustancias orgánicas muy diversas que aparentemente no tienen una función directa en el crecimiento y desarrollo. Pueden producirse en las plantas en forma constitutiva o ser inducidos por determinados factores de estrés (Cippollini y Bergelson 2000). Entre sus funciones se destacan: la defensa contra herbívoros y patógenos, la fotoprotección ante la exposición crónica a alta irradiancia y UV-B, la señalización para agentes polinizadores y dispersores, y la competencia planta-planta (alelopatía) o intra específica (autotoxicidad) (Vierstra et al. 1982, Bornmann y Vogelmann 1988, Karabourniotis et al. 1992, Lydon y Duke 1993, Stapleton y Walbot 1994, Karabourniotis et al. 1995, Harborne 1999, Harborne y Williams 2000, Mazza et al. 2000, Pichersky y Gershenzon 2002, Kliebenstein 2004, Eom et al. 2006). También pueden actuar a nivel radical como agentes de señalización en la colonización de las mismas por hongos presentes en el suelo, y posiblemente en la interacción con septados negros (dark septate endophytes - DSE) y/o bacterias, de igual manera previniendo la entrada de agentes patógenos (Smith y Read 1997). Estudios recientes han demostrado que el establecimiento de la simbiosis micorrícica arbuscular (MA) es el resultado de un intercambio de complejas señales entre el hongo y la planta hospedante (Vierheilig 2004), viéndose reflejados en variaciones de las concentraciones de flavonoides que estimulan la germinación de esporas, el crecimiento del micelio, la ramificación de las hifas (Aikawa et al. 2000, Scervino et al. 2005) y el desarrollo de la colonización micorrícica en la raíz hospedante (Siqueira et al. 1998, Guenoune et al. 2001, Siqueira et al. 2001, Akiyama et al. 2002, Larose et al. 2002, Lugo y Cabello 2002, Becerra et al. 2007).

Estudios previos sobre el género *Flourensia* han demostrado la existencia de una gran variedad de metabolitos secundarios en distintos órganos de las plantas y con un amplio espectro de actividades biológicas (Estell et al. 1998, Frederickson et al. 2000, Grayson 2000). En una revisión de más de 700 flavonoides isoprenilados, Barron e Ibrahim (1996) destacan al género *Flourensia* como uno de los 5 más importantes dentro de Asteraceae en relación con la acumulación de este tipo de compuestos.

Las resinas y los extractos de hoja (obtenidos por medio de solventes) en *Flourensia*, poseen efectos antialimentarios en insectos (Faini et al. 1997), citotóxicos (Uriburu et al. 2002), fitotóxicos (Mata et al. 2003), antifúngicos, antialgas y antitermitas (Tellez et al. 2001). En *F. oolepis* se han identificado de la misma manera efectos fitotóxicos (Palacios et al. 2007), insecticidas (García et al. 2007, Díaz Napal et al. 2009), antifúngicos (Carpinella et al. 2010) y antibacterianos (Palacios et al. 2007), mientras que en *F. campestris* este tipo de estudios todavía es escaso (Palacios et al. 2010).

La caracterización e identificación de los metabolitos secundarios de estas especies, la regulación de su producción como respuesta a condiciones ambientales, y su importancia en relación a los mecanismos de defensa frente a factores de estrés abióticos y bióticos, permitirán entender el rol que estos principios activos juegan en el mantenimiento de las poblaciones en su ambiente y evaluar su potencial como fuente de productos naturales para la agroindustria.

1.4.- Micorrizas: su rol en ecosistemas naturales.

En la rizósfera existen numerosos microorganismos (hongos, bacterias, virus) que actúan mutualista, parasítica, sinérgica o antagónicamente entre sí y con las raíces; múltiples y complejas relaciones que se ven reflejadas en el crecimiento y la fisiología de las plantas (Smith y Read 2008). Un gran número de microorganismos se encuentra en íntima asociación con la planta, a tal punto que ambos pueden depender de la presencia del otro para sobrevivir. Éste es el caso de las **Micorrizas**, una asociación simbiótica por la que las raíces de una planta y el micelio de un hongo obtienen beneficio mutuo. Este tipo de interacción se halla ampliamente distribuido, en más del 95 % de las plantas en condiciones naturales, y permite la adquisición de recursos limitantes (i.e., agua y nutrientes, Brundrett 2002).

Existen distintos tipos de asociaciones micorrizógenas, pero más del 80 % de las plantas terrestres poseen micorrizas arbusculares (MA) (Lambers et al. 2008, Smith y Read 2008). A la fecha se han identificado al menos 200 especies de hongos en MA, lo que los convierte en una de las asociaciones más frecuentes. Se clasifican en seis géneros dentro de la división Glomeromycota. Siendo *Glomus* el género más numeroso, poseen esporas relativamente simples y se asocian con una gran diversidad de plantas, ya que sin ellas como hospedantes son incapaces de desarrollarse (Brundrett 2002).

Las MA se caracterizan por la presencia de hifas inter e intracelulares en el cortex radical, que no producen cambios morfológicos apreciables en la estructura externa de la raíz involucrada, por lo que suelen pasar desapercibidas si no se utilizan las técnicas de tinción y microscopía apropiadas (Javot et al. 2007). Las MA son simbioses obligados, que a cambio de carbono (de la fotosíntesis vegetal), pueden proveer a las plantas de diversos beneficios, como una mayor facilidad en la adquisición de agua y nutrientes y protección frente a patógenos del suelo (Joner et al. 2000a,b, Koide y Kabir 2000, Augé 2001, Bago et al. 2000, Ezawa et al. 2002, Smith et al. 2004, Boulet y Lambers 2005, Li et al. 2006). El grado de dependencia micorrícica y el costo-beneficio de este tipo de asociación pueden variar dependiendo de la especie del hongo involucrada y su relación con el contexto biótico y abiótico del ambiente donde se

desarrollan (interacciones entre organismos, nutrientes del suelo, entre otros). Es esperable que las condiciones edáficas y climáticas también afectarán estas interacciones. Mediante este tipo de asociación, las plantas micorriza-dependientes obtienen un mayor beneficio respecto a aquellas especies con baja o nula dependencia (Van der Heijden et al. 1998a-b, O'Connor et al. 2002). En estos casos las MA pueden llegar a tener una gran influencia sobre la estructura y funcionamiento de las comunidades naturales (Hartnett y Wilson 2002), ya que estas ventajas diferenciales pueden influir sobre las habilidades competitivas de las plantas que actúan como hospedantes (Callaway et al. 2001, Collier et al. 2003). Solo recientemente se ha comenzado a tener en cuenta la asociación micorrícica como carácter funcional de las plantas (Cornelissen et al. 2001, Roumet et al. 2006, Lavorel et al. 2007). Ha sido de especial interés en la presente tesis comenzar a comprender cómo este tipo de interacciones afecta la biodiversidad, la estructura de las comunidades y el funcionamiento de los ecosistemas, así como por comprender la manera en que distintos tipos de estrés pueden afectar estas asociaciones. El estudio del tipo y grado de colonización de micorrizas en *F. campestris* y *F. oolepis* aportarán resultados que podrían explicar parte del éxito de estas especies en su ambiente natural. Este conocimiento además resulta de gran importancia para su conservación *ex situ* y su potencial domesticación.

1.5.- El género *Flourensia*

El género *Flourensia* es americano y pertenece a la familia Asteraceae (Compositae). Cuenta con 32 especies, que se distribuyen en su mayoría en las regiones secas y altas de América del Norte y del Sur. Tiene una distribución anfitropical con 13 taxones en América del Norte, principalmente en México (donde dos especies, *F. cernua* y *F. pringlei*, se extienden hasta el sudoeste de los Estados Unidos) y 18 taxones en América del Sur (Perú, Bolivia y Chile), de las cuales 12 están representadas en nuestro país.

En Córdoba, *F. campestris* y *F. oolepis* son componentes característicos del estrato arbustivo del Bosque Serrano (500-1200 msnm) (Molina Massey 1909, Seckt 1929, Cabido y Zak 1999), el cual se encuentra muy fragmentado debido a la tala intensiva y los incendios. Son especies asociadas a sitios disturbados, principalmente por el fuego, los que colonizan rápidamente. La recuperación de estas especies, luego de un fuego intenso, puede depender de estructuras perennantes que por su ubicación y/o características estructurales resisten al fuego, demostrando así su capacidad de rebrotar luego del disturbio (Grover y Musick 1990, Archer 1994). Este tipo de estrategia es una de las más frecuentes en especies que integran ecosistemas donde el fuego constituye un disturbio frecuente (Moreno y Oechel 1994).

1.5.1.- *Flourensia campestris* Griseb., Abh. Konigl. Ges. Wiss. Göttingen 19: 184.1874.

Arbustos de hasta 2 m de altura, tallos erectos, rojizos a marrones (Figura 1.1). Hojas lanceoladas a ovadas, glabras, cuneiformes a redondeadas en la base y acuminadas en el ápice, márgenes con leves denticulaciones (raramente enteras), estrigosas, de 5 a 9 cm de largo y 1,3 a 3,4 cm de ancho, pecíolos de 5 a 13 mm de longitud. Inflorescencia cimosa-corimbiforme, 5 a 15 capítulos, pedúnculos bracteados, puberulentos de 8 a 25 mm de largo. Capítulos radiados, de unos 8 mm de altura y 5 mm de ancho, involucros cilíndrico-acampanados, filarias en 2 series, lanceoladas a ovado-lanceoladas, de unos 4 a 5 mm de longitud, de 1 mm de ancho, atenuadas en el ápice, páleas oblongolanceoladas, de unos 8 mm de longitud, en el ápice obtusas a

truncadas. Flores marginales, 5-8, con lígulas ovales a oblongo-ovales, amarillas, 7-10 mm de largo, 3 a 4,5 mm de ancho, tubo de unos 4 mm de largo. Flores del disco 14 a 20, corolas cilíndricas, amarillas, de unos 5 mm de longitud, tubo de 0,5 mm de largo, lóbulos de 0,8 mm de longitud. Aquenios obcónicos, glabros, márgenes seríceos, de 5 a 6,5 mm de largo, papus de 2 aristas, 3,5 mm de largo, persistente. Número de cromosomas: $n = 18$ (Dillon 1984, Barboza et al. 2001).

Distribución: Sierras Chicas de Córdoba, Sierras de Ambato y Gracinana en el sudoeste de Catamarca y Sierras de Guasayán en el sudoeste de Santiago del Estero, Argentina (500-1000 msnm) (Dillon 1984, Barboza et al. 2001).



Figura 1.1. *Flourensia campestris* (Dillon 1984); A, rama florífera; B, capítulo; C, flor del disco

1.5.2.- *Flourensia oolepis* S. F. Blake, Contr. U. S. Natl. Herb. 20 (1): 406.1921.

Arbusto ramoso, glabro, glutinoso, con hijas alternas, pecioladas, aovadas o elípticas, íntegras o con dientes irregulares (Figura 1.2). Capítulos radiados, largamente pedunculados, solitarios en el extremo de las ramitas. Involucro semiesférico, con brácteas lanceoladas: paleas obtuso-triangulares. Flores dimorfas: las del radio femeninas, liguladas, amarillas, pero estériles; las del disco, tubulosas, hermafroditas. Ramas estigmáticas lanceoladas, con ápice triangular. Anteras con base subaguda. Aquenios seríceos. Papus formados por 2 aristas y varias pajitas intermedias (Dillon 1984, Barboza et al. 2001).

Distribución: Frecuente en las Sierras Chicas y Grandes de Córdoba (Dptos. CE, IS, PO, PU, SA, SJ) y en las Sierras de San Luis (Dillon 1984, Barboza et al. 2001).

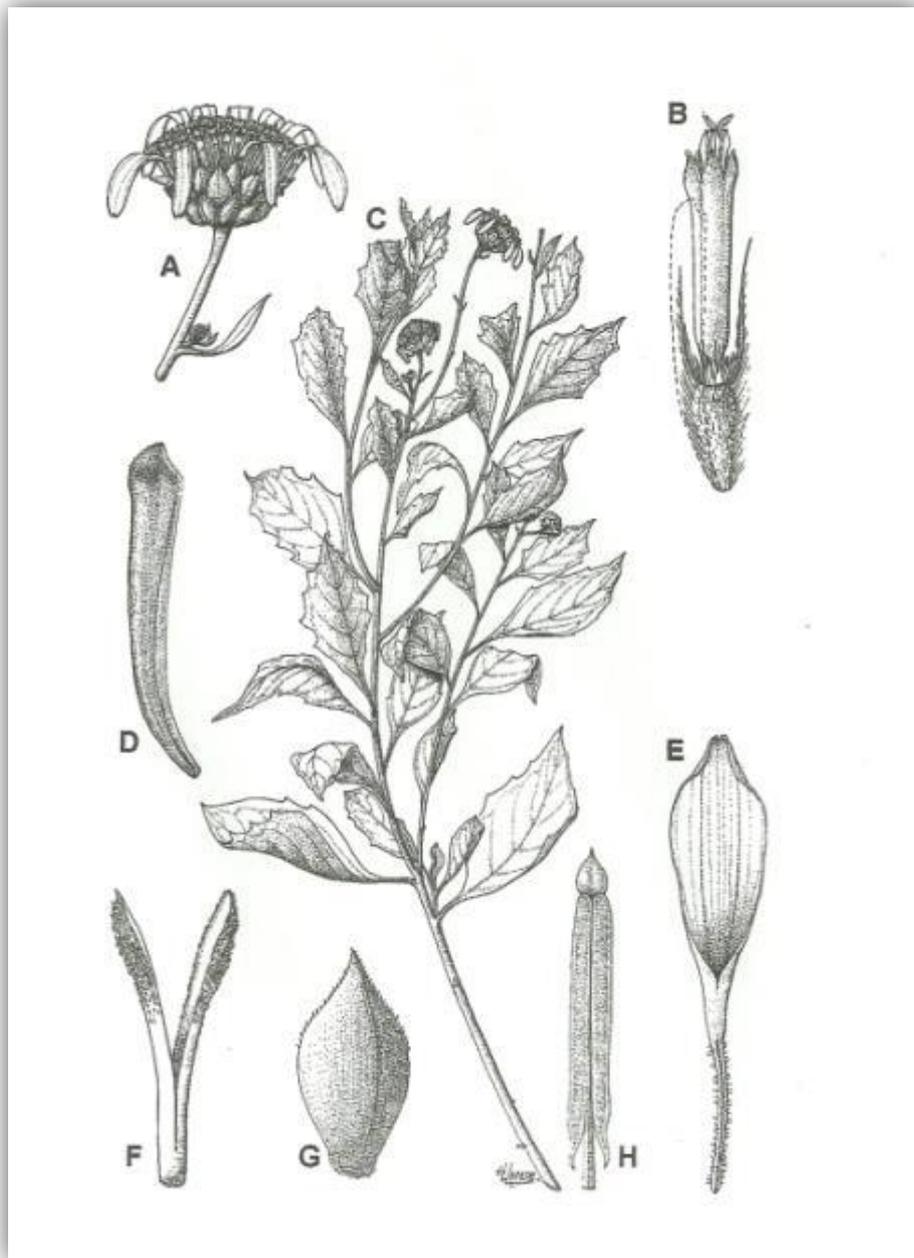


Figura 1.2. *Flourensia oolepis* (Ariza Espinar 2801 -CORD-). A: capítulos, x 1,5; B: flor tubulosa hermafrodita, x 5; C: rama florífera, 0,5; D: pétalos, x 6; E: corola de flor ligulada, x 3; F: ramas estigmáticas, x 15; G: brácteas del involucro, x 5; H: estambres, x15. Dibujo J. De Ugarte.

1.6.- Ubicación, Fisiografía y Clima del área de estudio

El área de estudio fue el Depto. Punilla, Provincia de Córdoba, Argentina (Figura 1.3). Esta unidad geomorfológica corresponde a la de las Sierras Grandes y Sierras Chicas. Ambos cordones montañosos pertenecen a las Sierras Pampeanas en la provincia de Córdoba. En este sistema serrano, la altitud varía entre los 700 y 1800 msnm, y en él se encuentran representados distintos sustratos litológicos. El desarrollo de los suelos está controlado por el relieve, predominando los litosoles en áreas con mayor pendiente, y suelos aluviales en los valles. Los suelos del Depto. Punilla han sido clasificados en 17 unidades (INTA Manfredi 2003). Las limitantes principales asociadas con los litosoles son: baja capacidad de retención de la humedad, pobres a moderadamente pobres en materia orgánica, escaso espesor, permiten el desarrollo de raíces entre 50 y 75 cm de profundidad, fuertes pendientes, moderada a alta pedregosidad y alta susceptibilidad a la erosión hídrica. Los suelos de las lomas onduladas de valles y terrazas se caracterizan por ser franco limosos o francos, moderados a bien provistos de materia orgánica, de moderada capacidad de intercambio, con ligera susceptibilidad a la erosión eólica y con ligera a moderada susceptibilidad a la erosión hídrica.

Desde el punto de vista fitogeográfico, la vegetación de las sierras corresponde al Distrito Chaqueño Serrano (Cabido y Zak 1999). La cubierta vegetal se distribuye en las sierras formando pisos de vegetación según la siguiente secuencia altitudinal: bosques entre los 700 y 1200 msnm, matorrales entre los 900 y 1500 msnm y pastizales a partir de los 1500 msnm. Los valles serranos de esta región suelen presentar palmares (*Tritrinax campestris*). La vegetación serrana ha sufrido el efecto de las actividades del hombre, quien a través del fuego, el sobrepastoreo y la tala, han modificado en forma dramática su fisonomía (Cabido y Zak 1999). Desde el punto de vista climático, corresponde a un clima templado mediterráneo, con veranos cálidos y los inviernos secos, no excesivamente rigurosos. La temperatura media anual está comprendida entre los 16 y 17° C aproximadamente, y una amplitud anual que es de 14 a 15° C. Las precipitaciones son de 500-600 mm anuales. Los vientos del este y del oeste son raros y de muy corta duración y fuerza. A partir de setiembre empiezan a predominar los vientos norte y el nordeste, que soplan con fuerza creciente a medida que un centro de depresión ciclónica se define en el frente polar. En los meses de verano son frecuentes las tormentas con vientos fuertes, aguaceros torrenciales y grandes descargas eléctricas, así como también el granizo, a veces de efectos destructivos.



Figura 1.3. Ubicación del Valle de Punilla, Córdoba Argentina. Imagen satelital Google Earth.

● Poblaciones estudiadas de *F.campestris* y *F.oolepis*.

1.6.1.- Áreas de estudio

Dentro del Depto. Punilla se seleccionaron cuatro áreas que presentaban poblaciones con características óptimas de crecimiento y desarrollo, y menor grado de intervención antrópica.

En la localidad de La Falda, las zonas seleccionadas para *F. campestris* fueron: “El Dragón” (ladera norte $31^{\circ} 05' 3,74''$ S y $64^{\circ} 27' 58,40''$ O, Figura 1.4) y “Río Pintos” ($30^{\circ} 57' 36,17''$ S, $64^{\circ} 35' 55,60''$ O, Figura 1.5).

En Capilla del Monte, los sectores escogidos para *F. oolepis* fueron: frente al dique “El Cajón” (ladera norte $30^{\circ} 51' 26,60''$ S y $64^{\circ} 33' 48,37''$ O, Figura 1.4) y camino a “Los Terrones” ($30^{\circ} 47' 9,19''$ S, $64^{\circ} 31' 50,05''$ O, Figura 1.5).



Figura 1.4. Áreas de muestreo: "El Dragón", *Flourensia campestris*; frente al Dique "El Cajón", *Flourensia oolepis*.



Figura 1.5. Áreas de muestreo: "Pintos", *Flourensia campestris*; camino a "Los Terrones", *Flourensia oolepis*

1.6.2.- Caracterización de los suelos (INTA Manfredi, 2003).

En las poblaciones ubicadas en El Dragón y El Cajón, los suelos son de laderas y pendientes escarpadas (Ustorthent lítico paralítico) 50 %. Presenta suelos excesivamente drenados, algo someros (75-50 cm). Tanto en superficie y en subsuelo son areno-francos, pobres en materia orgánica y con moderada capacidad de intercambio. Son suelos fuertemente inclinados o colinados (>10 %), muy pedregosos, con alta susceptibilidad a la erosión hídrica y muy baja capacidad de retención de humedad. Generalmente son de poco espesor, lo que permite el desarrollo radicular hasta 0,75 m de profundidad.

Los suelos de Pintos y Camino a los Terrones son excesivamente drenados, algo someros (75-50 cm). En superficie y en subsuelo son areno-francos, pobres en materia orgánica y con moderada capacidad de intercambio. Son suelos muy pedregosos, con alta susceptibilidad a la erosión hídrica y muy baja capacidad de retención de humedad. Generalmente son de poco espesor, lo que permite el desarrollo radicular hasta 0,75 m de profundidad.

1.6.2.1.- Caracterización físico-química y textural de los suelos

De cada población, se tomaron 3 muestras de suelo por área (entre 20 y 40 cm de profundidad). De cada muestra se determinó: textura, conductividad eléctrica (CE), pH por potenciometría (relación suelo: agua 1: 2,5), carbono oxidable (Nelson y Sommers 1982), nitrógeno total (Kjeldahl), CIC (capacidad de intercambio catiónico) y concentraciones de calcio, magnesio, sodio y potasio (Laboratorio Jarsun). Esta información se encuentra disponible en el Apéndice I.

2.- OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

El **objetivo general** de esta investigación fue aportar elementos sobre los mecanismos ecofisiológicos involucrados en la persistencia en ambientes naturales de *F. campestris* y *F. oolepis*, ambas especies nativas de la zona serrana de Córdoba con potencial valor agroindustrial.

Objetivos específicos

2.1.- Determinar los mecanismos y adaptaciones funcionales involucrados en la tolerancia de estas especies a factores de estrés abiótico, que facilitan su persistencia en ambientes naturales.

Cuestiones a abordar: ¿Cómo es la morfología y la arquitectura de la parte aérea y raíz de estas especies en su hábitat natural?, ¿cuáles son las estrategias reproductivas y qué relación guardan con el ambiente en que crecen?, ¿cómo se asignan los recursos entre la producción de vástagos vegetativos y reproductivos?, ¿cuál es el éxito reproductivo en estas especies?, ¿cuáles son los requerimientos para la germinación de semillas y cómo se relacionan con los factores ambientales que prevalecen en su ambiente natural?, ¿qué nivel de dependencia simbiótica con hongos micorrízicos presentan *F. campestris* y *F. oolepis* en su ecosistema?.

Para contestar esta serie de interrogantes se emplearon una combinación de estudios en poblaciones naturales de *F. campestris* y *F. oolepis* que involucraron:

- i. Descripción de la arquitectura y caracterización morfo-anatómica de las partes aéreas y de la raíz.

- ii. Estudios para determinar la asignación de recursos entre crecimiento vegetativo y reproductivo y el éxito reproductivo de las especies.
- iii. Ensayos de laboratorio bajo condiciones controladas para determinar los requerimientos para la germinación de semillas.
- iv. Grado de dependencia o asociación micorrícica.
- v. Relación de estas variables con los factores ambientales a que se hallan expuestas.

Hipótesis 1:

En ambientes con altas irradiancias, suelos pobres en nutrientes y baja disponibilidad hídrica, la presencia de adaptaciones morfo-anatómicas, características de especies xerófitas, serían las claves para su supervivencia. En estos sistemas, la reproducción vegetativa o capacidad de rebrote a partir de estructuras perennantes sería la forma de perpetuación más efectiva de las especies en ambientes ya colonizados. Asimismo, la reproducción sexual sería importante en la colonización de nuevas áreas, dependiendo del mantenimiento de la variabilidad genética. La germinación de semillas estaría controlada principalmente por las lluvias estacionales y la temperatura, manteniendo la viabilidad al menos por un año para poder responder a las condiciones ambientales favorables en la próxima estación de crecimiento. Ambas especies presentarían un alto grado de dependencia micorrícica que le confieren ventajas en la adquisición de nutrientes y agua.

2.2.- Determinar la presencia de aleloquímicos con actividad fitotóxica en *F. campestris* y *F. oolepis* que pudieran estar involucrados en la ecofisiología de estas especies.

2.2.1.- Investigar la bioactividad y determinar los efectos fitotóxicos de extractos acuosos y aceites esenciales de ambas especies.

Cuestiones a abordar: ¿Cuál es la composición química de los extractos acuosos?, ¿cuál es el efecto de los extractos acuosos y aceites esenciales de los distintos órganos de *F. campestris* y *F. oolepis* sobre la germinación y el crecimiento de otras especies vegetales?

En este punto se realizaron estudios y experimentos bajo condiciones controladas, que intentaron simular lo sucedido en ambientes naturales:

- i. Se evaluó la concentración de proteínas, concentración de sales, sólidos totales disueltos y pH de los extractos acuosos.
- ii. Se determinó por bioensayo en cápsulas de Petri, el efecto de extractos acuosos y aceites esenciales de los distintos órganos de *F. campestris* y *F. oolepis* sobre la germinación y el crecimiento de *Lactuca sativa*.
- iii. Se realizó una partición con solventes a fin de identificar qué componentes de los extractos acuosos poseen bioactividad.

Hipótesis 2:

La producción de compuestos alelopáticos inhibiría la germinación y el desarrollo de plantas de otras especies, siendo éste un importante mecanismo de competencia que facilita su persistencia en ambientes naturales. Los responsables de la bioactividad serían los metabolitos secundarios, presentes en hojas, raíces y estructuras

reproductivas. El efecto encontrado dependerá del órgano y la concentración, esperándose una mayor actividad en los extractos obtenidos a partir de hojas y raíces; ya que como exudados o por lixiviación estos compuestos pueden ser liberados al ambiente.

2.2.2.- Aislar e identificar los compuestos bioactivos de los extractos acuosos y aceites esenciales de poblaciones naturales de *F. campestris* y *F. oolepis*.

Cuestiones a abordar: ¿Cuál es el compuesto responsable de la bioactividad en extractos acuosos?, ¿cuál es la identidad química de este compuesto?, ¿cuál es la concentración del compuesto bioactivo en los distintos órganos de las dos especies?, ¿existen variaciones en la producción del compuesto entre las diferentes poblaciones muestreadas?, ¿cuáles son los compuestos volátiles de ambas especies?, ¿se encuentra el compuesto bioactivo aislado de extractos acuosos en los aceites esenciales?

Se emplearon estudios de laboratorio que permitieron:

- i. Determinar la fracción cruda del metabolito secundario responsable de la bioactividad.
- ii. Aislar e identificar el compuesto bioactivo.
- iii. Determinar la concentración del metabolito bioactivo en las diferentes especies, órganos y poblaciones.
- iv. Diseñar una técnica por TLC (2-D) para la determinación rápida y visual de la presencia del compuesto bioactivo.
- v. Identificar los compuestos volátiles de los aceites esenciales de ambas especies.

Hipótesis 3:

En *Flourensia* spp. se producirían en forma constitutiva un elenco importante de metabolitos secundarios, cuya composición relativa varía según la especie, el órgano involucrado y la época del año. Las variaciones en el grado de estrés provocarían modificaciones en los niveles y/o tipo de compuestos producidos, por lo tanto las poblaciones naturales que crecen en ambientes distintos presentarían cambios en la concentración de los compuestos que podrían participar como agentes alelopáticos y estar involucrados en la ecofisiología de las especies.

3.- DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

Cada una de las hipótesis planteadas se corresponde con un capítulo dentro de esta tesis. Así, en los Capítulos 2 y 3 se pone a prueba la Hipótesis 1, en el Capítulo 4 se encuentra desarrollada la Hipótesis 2 y por último, la Hipótesis 3 se prueba en el Capítulo 5. Finalmente, en el Capítulo 6, se presenta una conclusión general y las proyecciones del trabajo realizado, analizando de manera integral los principales resultados obtenidos en los capítulos anteriores, discutiendo las características del ciclo de vida de *F. campestris* y *F. oolepis*, sus adaptaciones morfológicas y fisiológicas y los principios activos que guardan relación con la ecofisiología de estas especies nativas en sus ambientes naturales.

Capítulo 2

Adaptaciones morfológicas y anatómicas involucradas en la persistencia de *Flourensia campestris* y *Flourensia oolepis* en ambientes naturales.

2.1.- INTRODUCCIÓN

La planta no es un objeto estático sino un organismo dinámico en constante crecimiento. Esta continua construcción es el resultado del equilibrio entre los procesos endógenos de crecimiento y las acciones exteriores ejercidas por el medio ambiente (Meusel 1939, Edelin 1984) y se manifiesta por la disposición relativa de los vástagos vegetativos (Hallé y Oldeman 1970). Es por ello que los estudios morfológicos sobre los aspectos integrales y dinámicos de los sistemas de ramificación de las plantas en el espacio y en el tiempo, tienen implicancias ecológicas y de manejo agronómico muy importantes (Meusel et al. 1977, Montenegro y Ginocchio 1992). La generación de módulos es propia de los procesos morfogénicos, esta actividad resulta de la producción de tres tipos fundamentales de unidades constitutivas: el meristema, el **metámero** y el **módulo** (Barlow 1989, 1994). El **metámero o fitómero**, es la unidad elemental de construcción del sistema de vástagos (White 1979, 1984) y está compuesto por la hoja, el nudo de inserción, su yema axilar, el entrenudo y en muchos casos raíces adventicias. Lo esencial de esta estructura es su repetitividad más que los detalles de su constitución (White 1979) y el hecho de que cada metámero posee un sitio (yema axilar) con potencialidad de generar un nuevo módulo (Barlow 1989, 1994). El **módulo** es la unidad resultante del desarrollo de una yema (Barlow 1989), así considerado es equivalente a un vástago; consecuentemente, es el conjunto de metámeros generados a partir de un meristema apical. La combinación de los tipos de módulos presentes en una planta determina diferentes patrones estructurales y conforma el **sistema de vástagos** (Barlow 1994). El análisis arquitectural de una planta pretende identificar los patrones de desarrollo endógenos, diferenciándolos de los efectos del medio (Puntieri et al. 1995). Para ello es necesario lograr la síntesis del patrón de desarrollo a partir de la observación de las características morfológicas de sus unidades estructurales y de la determinación de la secuencia de diferenciación ontogénica de éstas (Puntieri et al. 1995). Su identificación necesita de un completo diagnóstico de los aspectos morfológicos y funcionales de todas las categorías de ejes que se pueden reconocer en cada uno de los estadios de crecimiento (Tourn et al. 1999). Actualmente el análisis de las *sinflorescencias* se incorpora a estudios de la dinámica de desarrollo de las plantas (Kellog 2000). La *sinflorescencia* se define como el sistema de vástagos floríferos producidos a partir de la yema apical del eje embrional o de una yema axilar en los años subsiguientes (Troll y Weberling 1989). El análisis de la arquitectura y la morfología de la planta permiten una verdadera cartografía de la estructura vegetal, y prepara el terreno para un análisis más profundo de tipo cuantitativo (Tourn et al. 1999), permitiendo inferir la variabilidad de las poblaciones naturales (Puntieri et al. 1995) y lograr una simulación de la dinámica poblacional (Callaghan et al. 1990).

Las adaptaciones son características que desarrollan los organismos a lo largo de numerosas generaciones para la supervivencia, son el resultado de un gran número de interacciones entre los individuos y el medio en el que habitan. El primer escalón en la evolución de una nueva adaptación es la supervivencia en un determinado hábitat (Fahn y Cutler 1992); aquí el estrés juega un rol importante. En este sentido, las plantas han desarrollado un ajustado sistema de percepción del ambiente y mecanismos de respuesta que les permiten ajustar su crecimiento, morfología y fisiología a las condiciones ambientales, que en sistemas naturales son en general subóptimas. Las respuestas de las plantas al ambiente pueden estar directamente relacionadas con la falta de un recurso o pueden anticiparse a la escasez del mismo, de modo que la planta ajuste su funcionamiento antes que el factor limite todas las funciones fisiológicas. (Chapin et al. 1987). Asimismo, las plantas no solo responden a la escasez de un recurso, sino que

también pueden responder al exceso, como ocurre en adaptaciones a altas irradiancias (Taiz et al. 2006).

En suelos pobres en nutrientes, con escasas precipitaciones y alta radiación, las especies **xerófitas** presentan adaptaciones anatómicas y fisiológicas que les permiten sobrevivir en este tipo de ambiente. Entre las adaptaciones típicas de las hojas de estas especies puede observarse una epidermis foliar generalmente uni o pluristrata, con células pequeñas de pared externa gruesa y cutinizada (Pyykkö 1966), que contribuye a mantener la turgencia y le otorga una mayor resistencia al colapso por marchitez. Los estomas, generalmente en criptas, se distribuyen sobre todo en la epidermis adaxial para evitar el exceso de evapotranspiración. Los tricomas no glandulares permiten un cambio en la coloración de las hojas, de verdes a gris ceniciento, produciendo así una refracción lumínica (Vogelman 1993), reduciendo el exceso de radiación que llega a los tejidos. En los tricomas glandulares se producen metabolitos secundarios tales como resinas, taninos y aceites esenciales, los cuales se hallan involucrados en las interacciones de la planta con el ambiente biótico y abiótico. En ambientes donde el estrés hídrico es aún mayor y prolongado, suele aparecer una hipodermis a veces esclerificada, reforzando la estructura foliar, así como también presencia de cristales, como drusas, areniscas cristalinas y rafidios, permitiendo una reflexión uniforme de la radiación solar entre las células del mesófilo.

Los tallos de xerófitas suelen presentar una epidermis con cutícula gruesa y una corteza con numerosos estratos celulares que protegen el sistema vascular hasta que se forma la peridermis, mientras que la médula es reducida. El sistema vascular suele estar rodeado por vainas parenquimáticas: una externa (amilífera, endodermis) y una interna (vaina perimedular). En los tallos de muchas especies de *Asteráceas* que crecen en ambientes áridos se observa además la presencia de una endodermis cuya función es similar a la que poseen en raíz (Metcalf y Chalk 1950). El sistema radical es extenso y presenta raíces profundas para la captura de agua subterránea, y raíces paralelas a la superficie para aumentar la captación a nivel superficial. En la raíz, a diferencia de lo que ocurre en el tallo, el número de capas de células corticales tiende a disminuir, reduciendo el recorrido del agua desde su ingreso hasta el sistema de conducción (Esau 1965, Fahn y Cutler 1992).

En este punto no podemos dejar de mencionar a las asociaciones simbióticas entre las plantas vasculares y los microorganismos del suelo, que juegan un rol importante en estos ambientes, en donde muchas veces la disponibilidad de P, N, o cationes inmóviles, limita el crecimiento de la planta (Lambers et al. 1998).

En la rizófora conviven un gran número de microorganismos capaces de formar asociaciones simbióticas, tal es el caso de los hongos micorrícicos. El 82% de las angiospermas y el total de gimnospermas estudiadas hasta el momento presentan asociaciones con micorrizas (Brundrett 1991, 2002, Smith y Read 2008). En las Micorrizas Arbusculares (MA), las cuales reciben su nombre en función a la estructura de intercambio, el “arbúsculo”, una gran porción del micelio del hongo se ubica dentro de la raíz, en las células corticales y por fuera de la membrana celular. Durante la colonización interna (Genre y Bonfante 2005), la hifa del hongo ingresa creciendo por el espacio intercelular entre dos células epidérmicas o por dentro de la célula (sin dañar la membrana celular, espacio intracelular), definiendo un patrón de colonización anatómico de tipo “*Arum*” o “*Paris*” (Smith y Read 1997). El grado de dependencia micorrícica de las especies que integran una comunidad puede tener efectos profundos sobre las interacciones entre especies, pudiendo determinar cambios en la composición de la misma. Estudios en comunidades de plantas herbáceas, mostraron que la especie dominante tiende a tener una mayor dependencia micorrícica que las especies

subordinadas, de modo que la supresión de la simbiosis conlleva a un aumento en la diversidad de especies (Hartnett y Wilson 2002). En otras comunidades, en cambio, la diversidad de especies mostró una correlación positiva con el número de especies de hongos micorrícicos, observándose un aumento en el establecimiento y abundancia relativa de especies micorrizadas subordinadas respecto de las dominantes (Van der Heijden et al. 1998, O'Connor et al. 2001).

En la provincia de Córdoba el bosque serrano ocupa los valles, quebradas y faldeos de las Sierras Chicas entre los 800 y 1300 msnm. En estos ambientes la temperatura está sujeta a variaciones locales, accidentes del relieve, exposición a los vientos y variaciones de altitud. Las lluvias se concentran preferentemente entre la primavera tardía y fines del verano, variando entre 400 y 600 mm anuales, alternando años de precipitaciones mayores al promedio con otros de sequía (Capitanelli 1979). Entre las especies nativas más frecuentes se encuentran las “chilcas”, *Flourensia campestris* y *F. oolepis* (Asteraceae), formando verdaderas poblaciones denominadas chilcales (Luti et al. 1979), que soportan sorprendentemente no solo las variaciones en las lluvias sino la baja disponibilidad de nutrientes, las altas temperaturas, heladas y altas irradiancias. Sin embargo, las adaptaciones por las cuales dichas especies persisten en estos ambientes no han sido estudiadas hasta el momento.

En este contexto, como hipótesis de trabajo se postuló que en *F. campestris* y *F. oolepis* las adaptaciones morfo-anatómicas de especies xerófitas, y la capacidad de rebrote, serían las formas más efectivas para la perpetuación, como se observa en otras especies presentes en estos tipos de hábitat. Sumado a esto, la simbiosis micorrícica arbuscular compensaría, a modo de ‘buffer’, los efectos directos provocados por el sinergismo de los distintos factores ambientales sobre las propiedades físicas, químicas y funcionales de estas especies.

Cuestiones a abordar:

¿Cómo es la arquitectura y la morfología de la parte aérea y subterránea de estas especies en su hábitat natural?, ¿poseen alguna estrategia de reproducción vegetativa?, ¿qué relación guardan con el ambiente en el que crecen?, ¿qué nivel de dependencia simbiótica micorrícica presentan *F. campestris* y *F. oolepis* en su ecosistema?

Para responder a estos interrogantes se llevaron a cabo:

- a) Descripciones de la exomorfología y la arquitectura,
- b) Estudios endomorfológicos en hojas (características epidérmicas, estructura y ultraestructura), tallos (características epidérmicas, estructuras primaria y secundaria), raíz y xilopodio (estructura), e inflorescencias (base del capítulo, filarias, páleas y flores) de plantas coleccionadas en su ambiente natural.
- c) Ensayos controlados para cuantificar la colonización micorrícica arbuscular.

2.2.- MATERIALES Y MÉTODOS.

2.2.1.- Material Vegetal.

2.2.1.1.-Área de Muestreo

Las cuatro zonas de muestreo fueron “El Dragón” (*F. campestris*), “El Cajón” (*F. oolepis*) -Figura 1.3- Cap.1, “Río Pintos” (*F. campestris*) y “Los Terrones” (*F. oolepis*) -Figura 1.4 – Capítulo 1.

2.2.1.2. Muestreo

En cada sitio y para cada especie, se cosecharon plántulas y 10 individuos completos en estado reproductivo, para el análisis exomorfológico y arquitectural. Para los estudios endomorfológicos se utilizó material vegetativo y reproductivo de otros 10 individuos. Una parte del material cosechado fue utilizado en fresco mientras que el resto se fijó en FAA (formol, alcohol y ácido acético) y glutaraldehído al 2,5 %.

De cada población, se confeccionaron ejemplares de herbario que fueron depositados en el Herbario "Gaspar Xuárez" de la Facultad de Agronomía de la UBA (BAA 26.498 (*F. campestris*) y BAA 26.499 (*F. oolepis*)).

2.2.2.- Exomorfolología y Arquitectura

Se caracterizaron exomorfológicamente los diferentes vástagos siguiendo la metodología de Hallé et al. (1978) y Tourn et al. (1999). Para ello se analizaron 10 individuos de cada especie en los que se evaluaron las siguientes variables, según se detalla a continuación:

1) Categorías de vástagos; 2) Origen de los vástagos: adventicios o de yemas axilares; 3) Proceso de detención del meristema: aborto, parenquimatización o transformación; 4) Posición de las inflorescencias y flores sobre los ejes; 5) Morfología de las inflorescencias (*sensu* Weberling 1985).

Las variables así obtenidas se utilizaron para determinar grupos de caracteres morfológicos básicos para el hábito de la especie: a) modo de crecimiento (rítmico o continuo); b) modo de ramificación: presencia o ausencia de ramas, posición relativa en el eje principal (proximales y/o distales), tipo de ramificación monopodial o simpodial, disposición de las ramas (rítmica, continua o difusa); c) tipos de vástagos: plagiótropos u ortótropos, silépticos o catalépticos (Müller-Doblies y Weberling 1984); d) posición de las estructuras reproductivas: lateral o terminal; e) características del sistema radical.

2.2.3.- Endomorfolología.

2.2.3.1.- Microscopía óptica.

Para cada una de las especies se fijó (FAA) material proveniente de raíz, xilopodio juvenil, tallo primario (entrenudos), tallo secundario de 2-3 años de actividad cambial, hojas e inflorescencias. Dichos materiales se deshidrataron en una serie ascendente de alcohol etílico-xilol, se incluyeron en “Tissuemat” y se realizaron cortes transversales y longitudinales seriados con un micrótopo rotativo Minot. Los cortes fueron coloreados con safranina y un colorante de contraste, verde rápido (D’Ambrogio de Argüeso 1986).

Para el recuento de tricomas glandulares se utilizó material fresco de flores (liguladas y tubulosas), brácteas (páleas y filarias) y hojas. Para eliminar el exceso de sustancias presentes en superficie, el material se lavó con acetona y luego se montó con glicerina al 50% para su observación bajo microscopio óptico (MO). Las

fotomicrográficas fueron tomadas con una cámara digital Canon PowerShot A650 IS acoplada a un microscopio Wild M20.

En tallos primarios y secundarios se determinó el diámetro promedio de 50 vasos xilemáticos de distintos preparados (campo = 0,05 mm²). Esta información se obtuvo con el fin de relacionar las medidas de los diámetros de los vasos del xilema con la resistencia al estrés hídrico y la posibilidad o no de que los tejidos de conducción sufran embolias (Davis et al. 1999).

2.2.3.2.- Microscopía óptica de Fluorescencia (MOF).

El material cosechado en cada una de las poblaciones fue guardado en bolsas de polietileno con cierre hermético y colocado en heladera portátil a 4° C hasta su traslado al laboratorio, permaneciendo luego a la misma temperatura hasta su procesamiento completo. Las primeras observaciones se realizaron bajo lupa para definir el estado general de los primordios foliares, las hojas completamente expandidas, tallos y raíces (primarias y secundarias) al momento de realizar los cortes. Éstos se examinaron bajo luz UV (365 nm) con microscopía de fluorescencia, empleando un microscopio universal Axioplan Zeiss, en el que se examinaron las secciones y se fotografiaron.

2.2.3.3.- Microscopía electrónica

Para los estudios realizados con microscopía electrónica de transmisión (MET), el material (secciones de 1 mm²) fue pre-fijado en glutaraldehído al 2,5 % en buffer fosfato (pH 7,2) durante toda una noche y luego post-fijado con OsO₄ a 2° C en el mismo buffer por 3 h. Luego fueron deshidratados mediante una serie ascendente de etanol e incluidos en resina Spurr. Posteriormente se hicieron cortes delgados (1 µm) con ultramicrotomo Reichert-Jung y se tiñeron con azul de toluidina. La observación de estos cortes al MO permitió seleccionar el material más apto para realizar cortes ultrafinos (750 a 900 nm) para el MET (EM Philips 301 a 60,0 kV). Los cortes ultrafinos se realizaron con el mismo ultramicrotomo y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo (O'Brien y McCully 1981)

Para los estudios realizados con microscopía electrónica de barrido (MEB), el material fue fijado en FAA, deshidratado en una serie ascendente de alcohol etílico y posteriormente bañados en una fina capa de oro. Las observaciones fueron realizadas en un microscopio electrónico Zeiss a 15 kV.

2.2.3.4.- Cuantificación de tricomas glandulares, conductos resiníferos en las distintas estructuras y naturaleza de las sustancias secretadas.

Para ambas especies, se realizaron recuentos de pelos glandulares y conductos resiníferos en órganos vegetativos (hoja, tallos primario y secundario) y reproductivos (filarias, páleas, corolas de flores liguladas y tubulosas-pelos glandulares, base del capítulo y conductos). Se emplearon los mismos preparados utilizados para describir la endomorfología de los distintos órganos con MO, observando 30 campos de 1 mm².

Siguiendo la metodología propuesta por Combrick et al. (2007), se realizó la visualización de los cortes transversales de los distintos órganos bajo luz azul y/o UV-B, lo cual permitió identificar la naturaleza de los compuestos producidos por los pelos glandulares y conductos.

2.2.4.- Micorrizas Arbusculares (MA).

2.2.4.1.- Detección y caracterización de MA

En abril de 2009, de cada una de las poblaciones se obtuvieron cinco muestras de suelo conteniendo raíces de *F. campestris* o *F. oolepis*. De cada muestra se tomaron raíces al azar (Luoma et al. 1996), las que fueron clareadas y teñidas según la técnica de Grace y Stribley (1991) y observadas bajo microscopio óptico.

Para la caracterización morfo-anatómica de la colonización radical MA se consideró la localización de las hifas (intracelular o intercelular), la presencia de arbusculos, vesículas y circunvoluciones típicas y arbusculadas (Smith y Read 2008). En relación a los de endofitos septados oscuros, se consideró la presencia de micelio pigmentado y microsclerocios según lo descrito por Barrow (2003), Barrow y Aaltonen (2001) y Jumpponen y Trappe (1998). Se cuantificó el porcentaje de colonización micorrícica arbuscular total (hifas + vesículas + arbusculos) y la colonización por vesículas, por arbusculos y por hifas de acuerdo la metodología propuesta por Mc. Gonigle et al. (1990). Para evitar sesgos, las muestras fueron codificadas por un tercero hasta el análisis de los resultados.

2.2.4.2.- Efectos de la simbiosis MA sobre el crecimiento.

Se realizaron ensayos bajo condiciones controladas empleando plántulas obtenidas a partir de semillas. Éstas fueron germinadas en sustrato estéril y luego se trasplantaron a macetas (1L) sujetas a dos tratamientos: con y sin inóculo micorrícico nativo. El inóculo micorrícico se obtuvo haciendo crecer plantas trampa (ej. *Sorghum spp.*) en suelo nativo. A los dos meses se realizó un homegeneizado del suelo de la rizósfera y raíces de *Sorghum spp.*; esta mezcla fue utilizada como inóculo micorrícico. Para el inóculo no micorrícico se empleó la misma mezcla, la cual fue esterilizada (autoclave: 120° C, 2 h) antes de su utilización.

Las macetas a las que se aplicaron los tratamientos contenían una mezcla de suelo esterilizada: arena esterilizada: vermiculita en una proporción de 1: 1: 1, a las que se les adicionó 50 cm³ de inóculo por maceta, de acuerdo al tratamiento (Soares et al. 2005, Wolfe et al. 2006). A cada maceta se le adicionó, por única vez al comienzo del experimento, 2 g de N:P:K por ser los suelos nativos pobres en nutrientes. En todos los tratamientos las plántulas fueron mantenidas en condiciones hídricas favorables. Ensayos previos demostraron que la disponibilidad de inóculo en la mezcla era suficiente para producir una infección adecuada. Luego de 3 meses de iniciado el ensayo, se cosecharon las plantas sobre las que se midió: longitud del tallo y de la raíz y el número de hojas. De cada fracción se obtuvo el peso fresco y el peso seco (en estufa a 60 °C hasta constancia de peso). A partir del material seco se obtuvo el peso de cada fracción y la biomasa total. Del total de los individuos cosechados por tratamiento, se utilizaron las raíces frescas del 50 % de las plántulas para la cuantificación de las micorrizas. Las raíces fueron cuidadosamente lavadas, clarificadas y teñidas según la metodología propuesta por Grace y Stribley (1991), siendo luego montadas en ácido láctico para ser observadas y fotografiadas al MO (X10, X40 y X100). Se cuantificó el porcentaje de colonización micorrícica arbuscular total (hifas + vesículas + arbusculos) y la colonización por vesículas y por arbusculos de acuerdo la metodología propuesta por Mc. Gonigle et al. (1990).

2.2.5.- Análisis estadístico de los datos

Las variables fueron comparadas estadísticamente utilizando el programa Infostat (2010 P). Se realizaron pruebas de ANOVA y el test de Tukey con el objetivo de

determinar si existen diferencias significativas entre las variables estudiadas en cada caso.

2.3.- RESULTADOS

2.3.1.- Caracterización morfológica y arquitectural de *F. campestris* y *F. oolepis*.

Ambas especies poseen plántulas epígeas y plantas juveniles con raíces e hipocótilo (Figura 2.1). Durante el primer y segundo año de desarrollo de las plántulas, se inicia la formación de un xilopodio que se origina a partir del hipocótilo (incluye el nudo cotiledonar) y la raíz primaria. Este órgano, de doble origen, cumple varias funciones sumamente importantes, como la absorción y reserva de agua, la cual es acumulada en la porción proximal de la raíz pivotante. Mientras que, la sección caulinar se relaciona con la producción de brotes, ya que este órgano produce yemas las cuales originan reiteraciones catalépticas (Figura 2.2). En los individuos adultos, estas reiteraciones se observan como una corona de vástagos aéreos ubicados en la parte superior del xilopodio leñoso (Figura 2.2 A).

F. campestris y *F. oolepis* presentan vástagos aéreos ortótropos de crecimiento continuo, con ramificación monopodial y difusa hasta la madurez reproductiva (Figura 2.3). En el eje principal, el crecimiento es continuo y definido, y se encuentra determinado por la formación de la primera inflorescencia (panícula) o por la muerte del meristema apical, provocada por las bajas temperaturas invernales y/o las sequías prolongadas que ocurren en su ambiente natural. Las ramificaciones laterales son entonces simpodiales (Figura 2.3, zona de ramificación); la disposición de las hojas es alterna, con una o dos yemas axilares en serie (accesorias seriales). Cada yema tiene un potencial de desarrollo diferente, en general las yemas axilares distales desarrollan vástagos reproductivos, mientras que las proximales desarrollan vástagos vegetativos (Figuras 2.3). En las dos especies estudiadas, las reiteraciones se desarrollan a partir de yemas axilares proximales, tanto del xilopodio como de la porción basal del eje principal.

La floración se produce durante los meses de diciembre y enero, y se puede extender hasta marzo en algunos años. Las inflorescencias son panículas de capítulos, terminales y axilares (Figura 2.4 A y B). En ambas especies, la yema axilar de la última hoja tectriz queda remanente y produce nuevas ramificaciones reproductivas – ejes de innovación- durante el año siguiente. En *F. campestris* las panículas poseen de 5 a 15 capítulos (Figura 2.5 A), con dos series de filarias imbricadas en los involucros, mientras que en *F. oolepis* distinguimos panículas de capítulos con 2-3 cabezas (Figura 2.5 B) e involucros con tres series de filarias imbricadas. En ambas especies la porción distal de los vástagos reproductivos muere cada final de temporada de crecimiento, mientras que la sección proximal sigue siendo vástago de construcción (Figura 2.3).



Figura 2.1 Plantas juveniles con raíz e hipocótilo contráctiles ○ de *F. campestris* (A-B) y de *F. oolepis* (C-D).

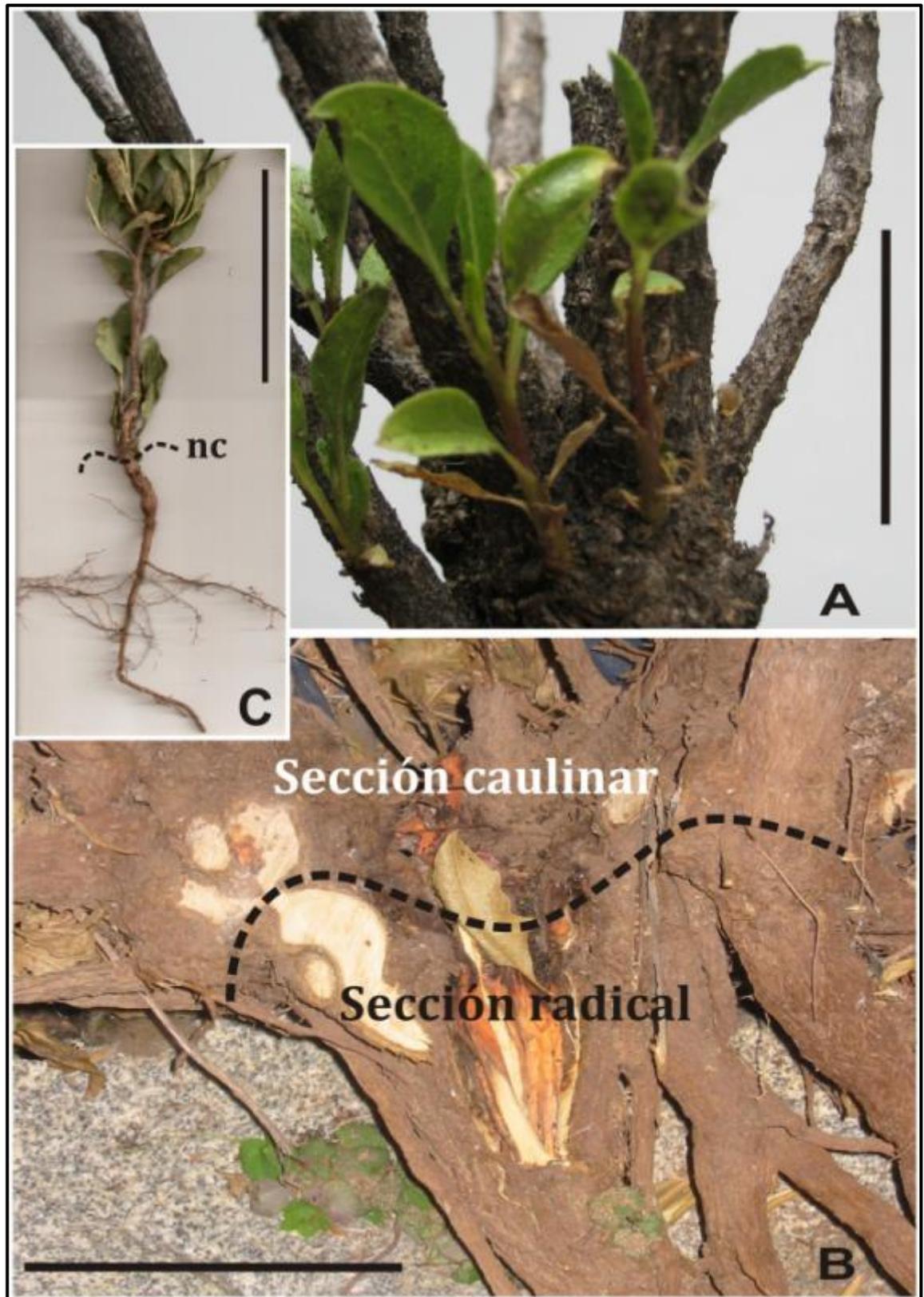


Figura 2.2. Xilopodio. **A:** *F. campestris*, se observan las reiteraciones, producidas por las yemas adventicias de la sección caular del xilopodio de individuos adultos. **B:** corte longitudinal del xilopodio de *F. oolepis*, en el que se visualizan las dos secciones que lo forman (caular y radical). **C:** Individuo juvenil de *F. campestris*, se visualiza el inicio del xilopodio a partir del nudo cotiledonar (nc), incluye engrosamiento del hipocótilo y de la porción proximal de la raíz. Escala: A-C 10 cm.

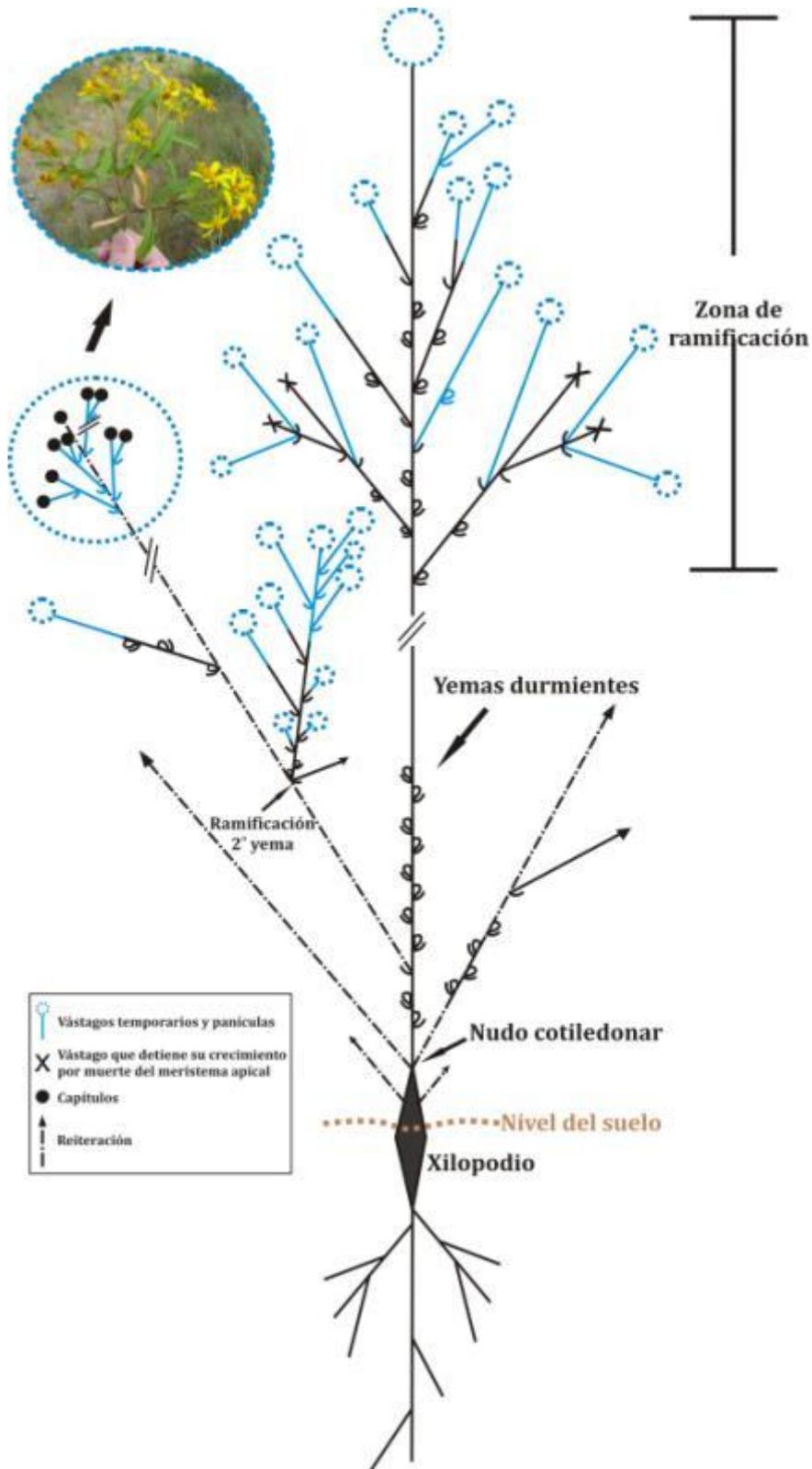


Figura 2.3 Representación esquemática de la arquitectura de *F. campestris* y *F. oolepis*. Ambas especies presentan un vástago aéreo de crecimiento continuo definido, con ramificación simpodial y difusa. La fotografía se corresponde con la panícula de capítulos representada en el esquema.



Figura 2.4. Inflorescencias. **A.** *F. oolepis*: detalle de la porción distal de la panícula, nótese el desarrollo del capítulo apical, el primero en florecer; **B.** *F. campestris*: panículas de capítulos terminales y axilares. Escala: A-B: 2,3 cm.



Figura 2.5. Inflorescencias. **A:** *F. campestris*: panículas de 5 a 15 capítulos; **B:** *F. oolepis*: panículas con 2-3 capítulos. Escala: **A-B:** 2,3 cm.

2.3.2.- Endomorfología.

2.3.2.1.- Endomorfología de órganos vegetativos y reproductivos de *F. campestris* y *F. oolepis*.

Para cada órgano se describen los resultados comunes en ambas especies y luego las características propias de cada una de ellas.

ÓRGANOS VEGETATIVOS

Hojas

En corte transversal de la hoja, se observó una cutícula de 0,97 μm de espesor, similar en ambas caras, una epidermis foliar unistrata con células epidérmicas típicas, estomas sobre elevados y dos tipos de tricomas: glandulares (peltados) y eglandulares (Figura 2.6 A). El mesófilo es isolateral, con parénquima en empalizada hacia ambas caras y con conductos “resiníferos” próximos a los haces vasculares (nervio principal y secundarios). Suele observarse esclerénquima conspicuo asociado a los nervios - casquetes de fibras en el floema- (Figura 2.6 A) y en los bordes de la lámina foliar.

Los tricomas eglandulares son pluricelulares uniseriados con 3 a 6 células, mientras que los glandulares (tricomas peltados) poseen 3 células basales, un pequeño pie bicelular biseriado y una cabezuela pluricelular biseriada formada generalmente por 6 a 8 células, las cuales presentan una cutícula propia y una capa cuticular (Figura 2.6 B). Los tricomas en ambas especies se encuentran distribuidos preferentemente sobre los nervios (Figura 2.7 A y C) y el borde de la lámina foliar.

Observaciones realizadas con el MET mostraron que las células secretoras de los tricomas glandulares poseen un citoplasma denso con presencia de leucoplastos y mitocondrias (Figura 2.8 A). Asimismo, pudieron observarse pequeñas gotas de consistencia aceitosa, que son englobadas en vesículas producidas por los dictiosomas, las cuales terminan fusionándose con el plasmalema (Figura 2.8 B). A medida que el tricoma madura, la cutícula comienza a desprenderse de la pared celular (la cual posee dos capas: una de celulosa y otra más externa pecto-celulósica), y la secreción empieza a acumularse en la cámara subcuticular recién formada (Figura 2.8 A-B). Durante este estado de activa secreción, la ultraestructura celular se caracteriza por una intensa proliferación de retículo endoplasmático rugoso, la presencia de mitocondrias próximas al plasmalema y abundantes cloroplastos, leucoplastos, vacuolas y vesículas dictiosómicas con material de naturaleza lipídica (Figura 2.8 A, B, F y G). En *F. campestris* se observa claramente, en la pared celular de las células de la cabeza del pelo glandular, la pérdida de la matriz fibrilar externa y la acumulación de secreción en los nuevos espacios interfibrilares (Figura 2.8 C y D), lo que promueve la separación de la cutícula y de la capa pecto-celulósica de la pared (Figura 2.8 D). La acumulación sucesiva de dicha secreción en esta cavidad le confiere a la célula de la cabeza de los tricomas la forma esférica característica que presentan. Los espacios interfibrilares, que inicialmente eran pequeños y alargados (Figura 2.8 C), se amplían transformándose en redondeados con un contenido de aspecto electrodense (Figura 2.8 D). Este tipo de estructuras vesiculosas son interpretadas como los glóbulos de secreción lipofílica en una fase hidrofílica. Cuando los espacios interfibrilares se encuentran saturados de contenido, la cutícula se rompe y la sustancia es excretada al exterior (Figura 2.7 D y 2.8 C y D). En *F. oolepis* la sustancia producida se acumula en la cámara subcuticular y atraviesa la laxa cutícula hacia el exterior sin presentar poros (Figura 2.7 B y 2.8 A-B).

En ambas especies, los conductos son esquizógenos y se encuentran formados por 2-3 capas de células secretoras, siendo la capa más interna típicamente de mayor actividad. Esta capa se encuentra formada por células especializadas que tapizan el

lumen del conducto y recibe el nombre de epitelio (Figura 2.9 A). Los conductos se hallan distribuidos en el clorénquima próximos a los haces vasculares (Figura 2.6 A).

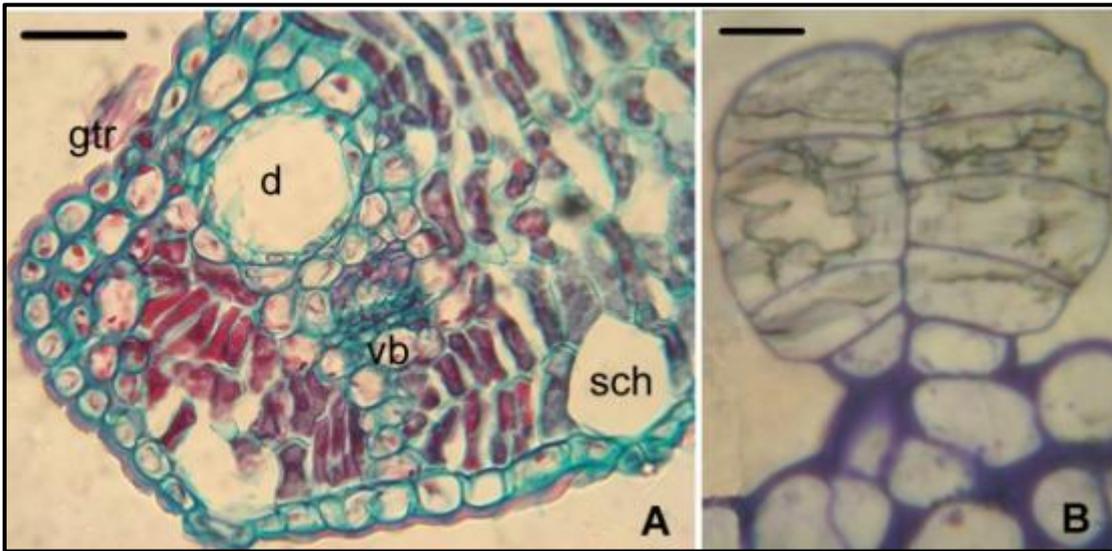


Figura 2.6 Fotomicrografías con microscopio Wild M20. **A:** Corte transversal de hoja (*F. campestris*) se observa: una cutícula delgada, epidermis foliar unistrata con típicas células epidérmicas, **gtr:** tricoma glandular (peltado); **d:** ducto o canal resinífero; **sch:** cámara subestomática; **vb:** haz vascular. **B:** tricoma glandular con 3 células basales, pie bicelular biseriado y cabezuela pluricelular biseriada formada generalmente por 6 a 8 células. Escala: **A** (27,5 μm); **B** (2 μm).

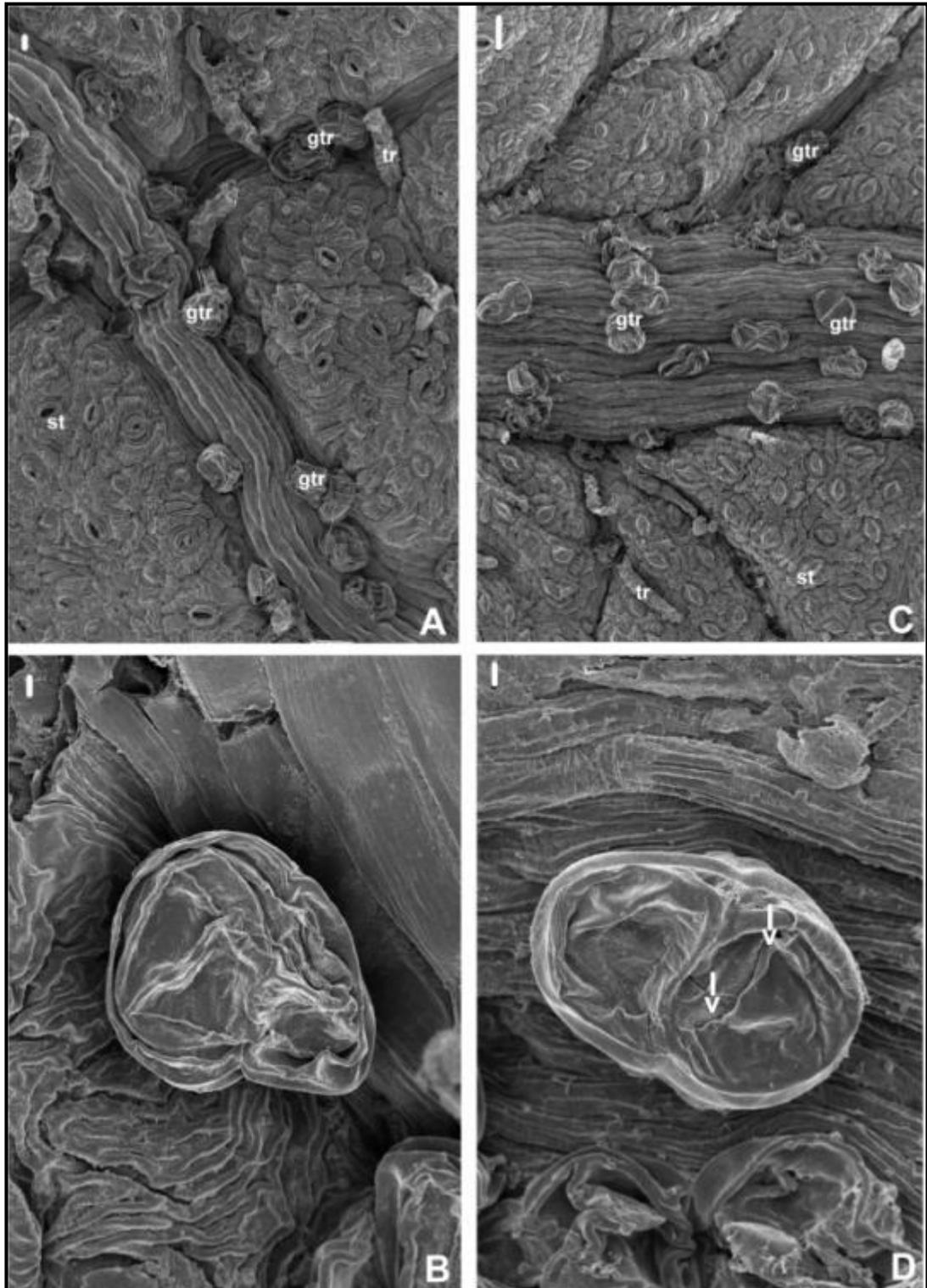


Figura 2.7 Fotomicrograffías de hoja (MEB). **A:** epidermis, cara abaxial de *F. oolepis*, se observan los tricomas glandulares -gtr- y tricomas eglandulares -tr-, distribuidos sobre los nervios con mayor densidad; st: estomas sobre-elevados. **B:** *F. oolepis*: cabeza del tricoma glandular con cutícula sana, las sustancias producidas atraviesan la laxa cutícula hacia el exterior sin presencia poros. **C:** epidermis, cara abaxial de *F. campestris*, se observa la disposición de los tricomas. **D:** *F. campestris*: cabeza del tricoma, se observa la cutícula rasgada por donde son excretadas las sustancias. Las flechas indican el sector donde se produce el poro para la salida de la secreción. Escala: **A** (10 μm); **B** (3 μm); **C** (30 μm); **D** (10 μm).

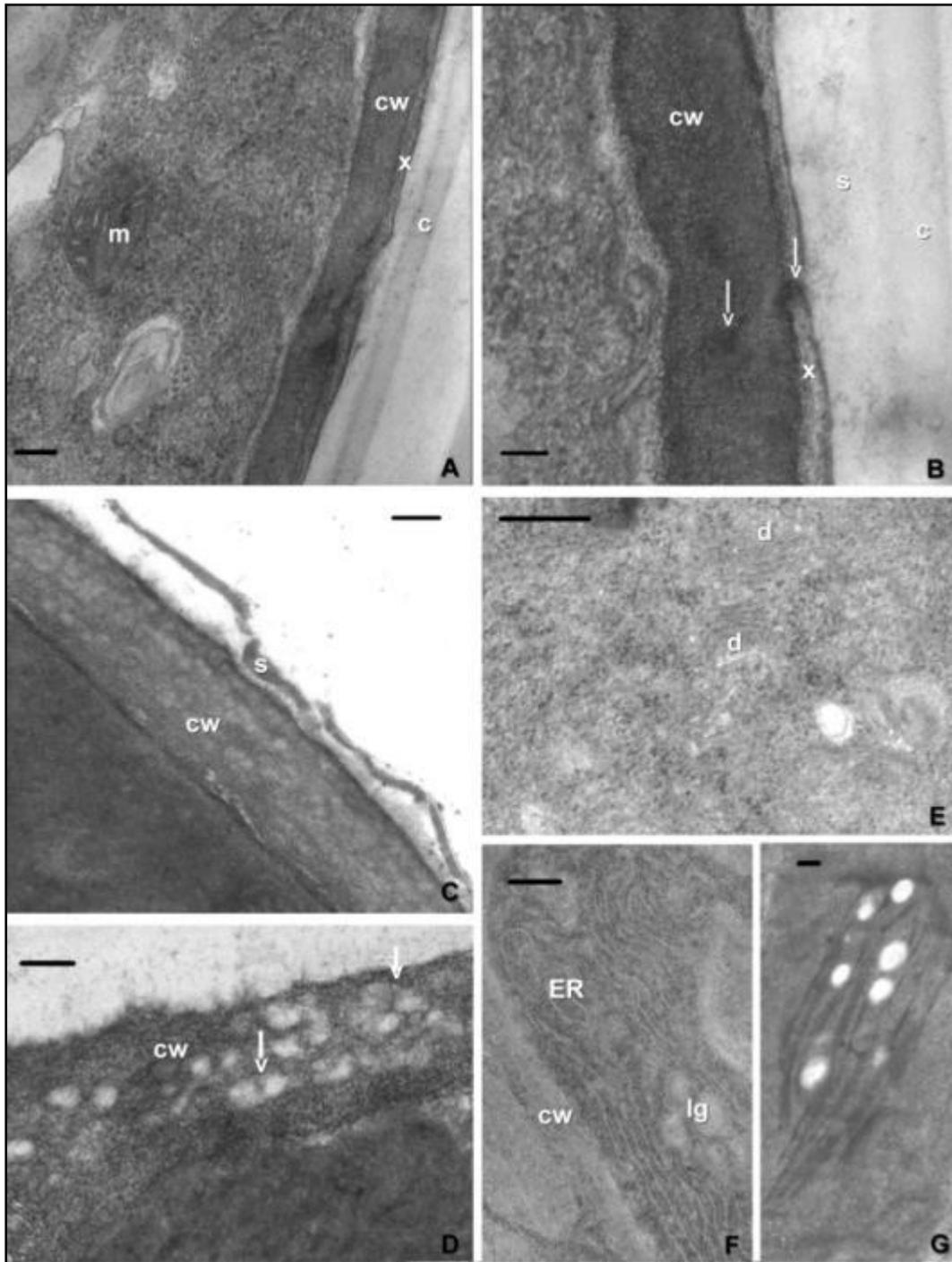


Figura 2.8 Fotomicrografías de la ultraestructura celular del tricoma glandular de una hoja de *F. oolepis* y *F. campestris* (MET). **A:** *F. oolepis*: se observa el citoplasma electrodens con la presencia de mitocondrias **-m-**, pared celular **-cw-** con una capa exterior **-x-** pectocelelósica con microfibrillas de celulosa laxas y cutícula **-c-** gruesa. **B:** *F. oolepis*: se indica con flecha el recorrido de las sustancias lipofílicas atravesando la pared celular hasta la cámara subcuticular donde se acumula **-s-**. Las sustancias son liberadas al exterior a través de la laxa cutícula exterior sin presentar poros. **C:** *F. campestris*: se puede observar claramente en la pared celular **-cw-** y la secreción acumulada **-s-** en los nuevos espacios intrafibrilares. **D:** *F. campestris*: las flechas señalan las vesículas lipofílicas acumuladas transitoriamente en la pared; estas sustancias son almacenadas en la cámara subcuticular y posteriormente liberadas al exterior con ruptura de la cutícula (poro). **E:** *F. campestris*: vista del contenido celular de las células del pie en la que se observan abundantes dictiosomas **-d-**. **F:** *F. oolepis*: detalle del retículo endoplasmático rugoso **-ER-** próximo a la pared celular **-cw-** y vacuolas con glóbulos lipídicos **-lg-**. **G:** *F. campestris*: detalle de un cloroplasto con gránulos de almidón. Escalas: **A** (200 nm); **B** (100 nm); **C** (200 nm); **D** (100 nm); **E** (200 nm); **F** (500 nm); **G** (200 nm).

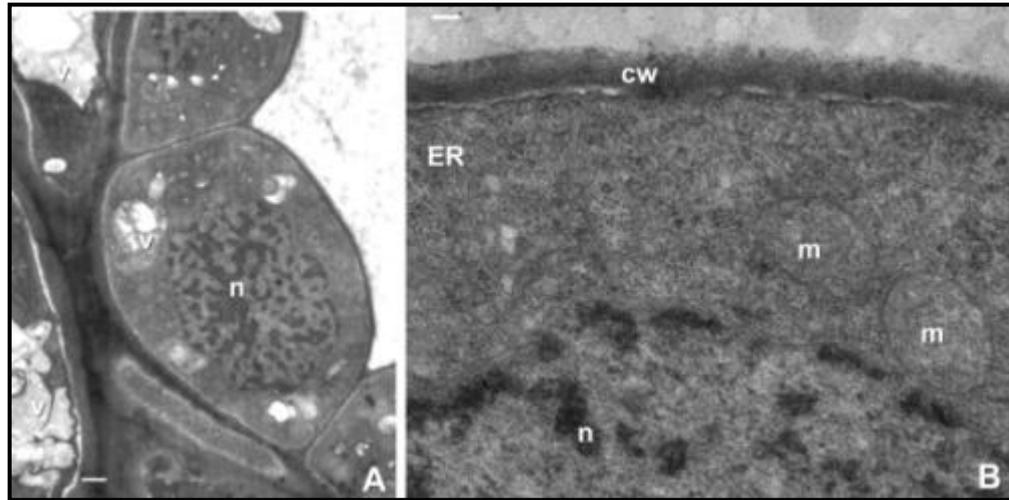


Figura 2.9 Fotomicrograffas de los canales resiníferos en hojas de *F. campestris* y *F. oolepis* (MET). **A:** *F. campestris*: detalle de las células epiteliales hacia el interior del conducto. Se observan numerosas vacuolas lipídicas -v-, las cuales se encuentran en contacto con la pared tangencial externa muy invaginada, y un gran núcleo -n-. También se observan células subepiteliales con vacuolas lipídicas y pared suavemente invaginada. **B:** *F. oolepis*, detalle del contenido de las células epiteliales, **n**: núcleo; **m**: mitocondria; **ER**: retículo endoplasmático rugoso; **cw**: pared celular. Hacia el interior del ducto (lumen), la pared celular aparece degradada. Escalas: **A** (1 μ m); **B** (200 nm).

Tallos

En ambas especies, la sección transversal del tallo con estructura primaria (entrenado) presenta una epidermis unistrata con una cutícula delgada, y solo en tallos jóvenes se hallaron abundantes tricomas glandulares (Figura 2.10 A-B). En algunos individuos se observó una hipodermis, con 2 a 3 capas de células (Figura 2.10 D). Los conductos secretores están distribuidos en el parénquima cortical próximos a los haces vasculares y en la zona de la médula (Figura 2.10 A, C-D y Figura 2.11 B).

Los haces vasculares son colaterales y se hallan rodeados por una importante vaina parenquimática; a su vez, rodeando a todos los haces vasculares, se encuentra otra vaina parenquimática unicelular denominada “endodermis” (*sensu* Lima y Menezes 2009). La región del floema y xilema primario presenta casquetes de fibras. (Figura 2.10 C y D).

Cuando se inicia la actividad secundaria, el procambium fascicular y el parénquima interfascicular se transforman en cambium que origina floema y xilema secundario, observándose como un cilindro completo (Figura 2.11 A). A partir del cambium y en la región del floema secundario se desarrollan nuevos canales o ductos (Figura 2.11 C).

El xilema secundario presenta porosidad anular con vasos homogéneos escasos y abundantes fibras. Generalmente, se distinguen radios xilemáticos uniseriados, pero también podemos hallar algunos con 2-3 hileras de células (Figura 2.11 A).

El diámetro de los vasos xilemáticos fue significativamente ($p < 0,05$) mayor en los tallos secundarios ($20,82 \pm 3,0$ y $17,74 \pm 2,5$, para *F. campestris* y *F. oolepis*, respectivamente) comparado con los tallos primarios de ambas especies ($11,21 \pm 1,6$ y $9,73 \pm 1,4$, para *F. campestris* y *F. oolepis*, respectivamente).

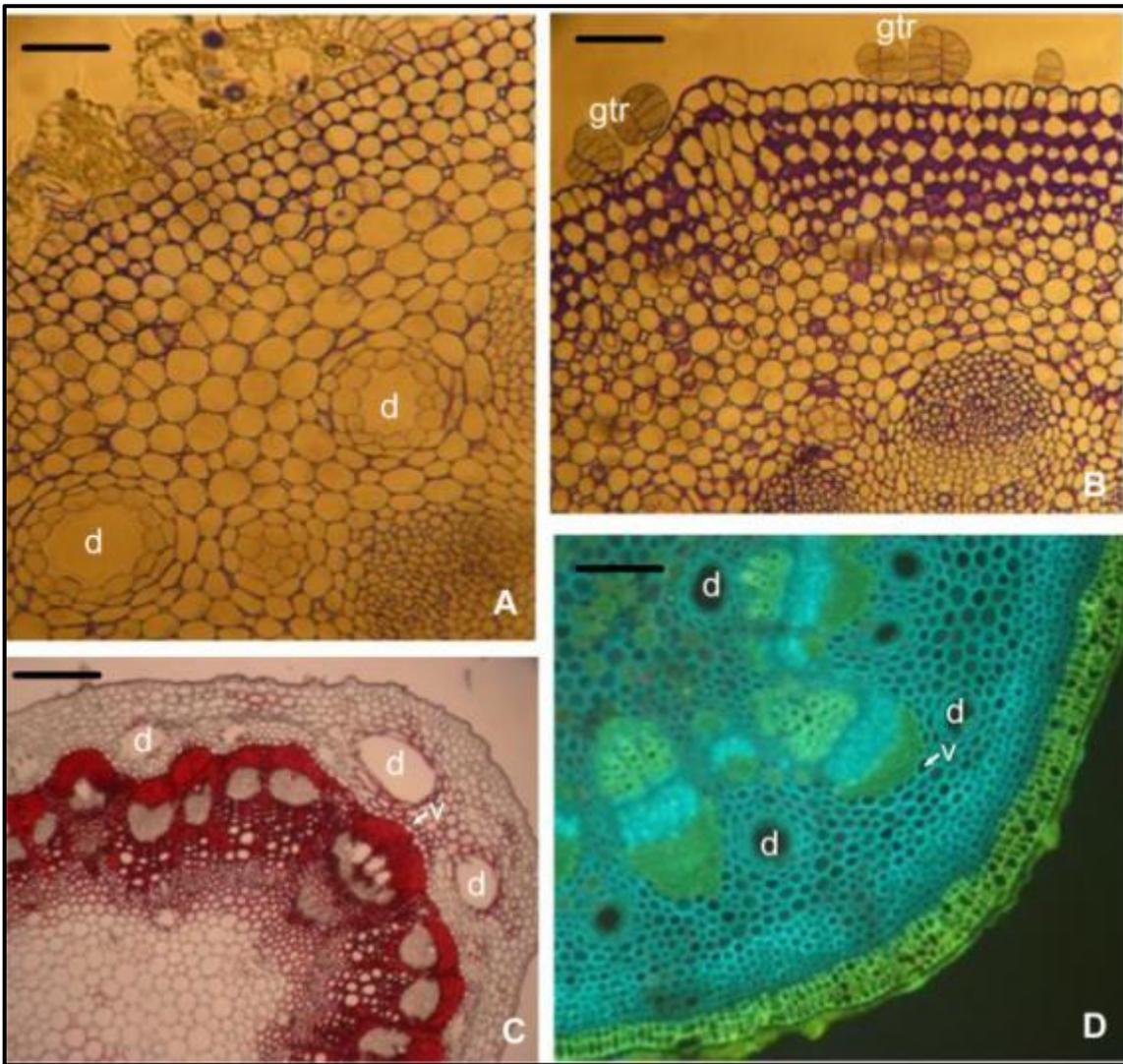


Figura 2.10. Fotomicrografía de cortes transversales de tallo primario (MO). **A:** *F. oolepis*, se observan los tricomas glandulares y la secreción, algunas capas de colénquima (tejido de sostén) y los canales juveniles en la corteza -**d**- próximos a los haces vasculares. **B:** *F. campestris*, tallo primario con tricomas glandulares -**gtr**-. **C:** *F. campestris* con inicio de crecimiento secundario, se observan los casquetes de fibras más conspicuos en la zona del protofloema y la vaina parenquimática -**v**-. En la médula, próximos al xilema y en la corteza, se observan canales -**d**-. **D:** *F. campestris*, material fotografiado con microscopio de fluorescencia (UV), se observa la autofluorescencia de los tricomas y de la hipodermis (2-3 capas de células). Vaina parenquimática -**v**-. Escalas: **A** (40 μm); **B** (55 μm); **C** (110 μm); **D** (75 μm).

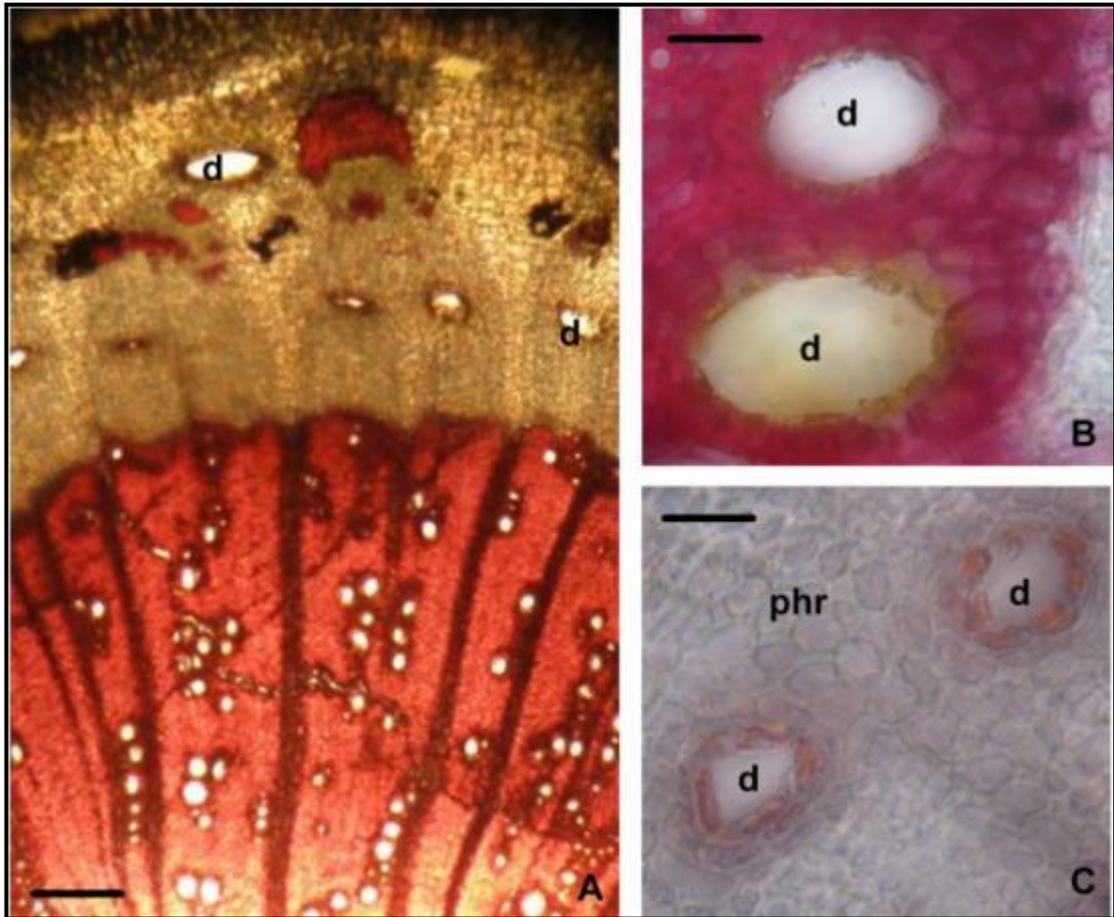


Figura 2.11. Fotomicrografías de secciones transversales de tallo secundario con tres períodos de crecimiento. *F. oolepis* (MO). **A:** canales resiníferos -d- distribuidos en la corteza próximos a los casquetes de fibras del protofloema. Los conductos más internos, en el floema secundario, son producto de la actividad cambial. **B:** detalle de los conductos -d- próximos al protoxilema (que quedan en la porción interna del tallo). En su interior se observan las resinas producidas, adosadas al epitelio. **C:** detalle de los ductos -d- próximos a los radios floemáticos -phr-. Escalas= **A** (115 μ m), **B** (76 μ m), **C** (37 μ m).

Raíz y xilopodio

En los cortes transversales de la raíz a la altura de la exodermis se observaron varias capas de tejido parenquimático (corteza), con una típica endodermis con Bandas de Caspary, el periciclo y los tejidos vasculares alternos con 4 grupos o polos (tetraarca) (Figura 2.12 A). Los ductos o canales “resiníferos” se originan próximos a la endodermis en posición extra-endodérmica. Las células por fuera de la endodermis - próxima al floema- se dividen en sentido radial, dando origen a las primeras células de los canales.

El xilopodio joven presenta conductos resiníferos semejantes a los de los tallos en la zona cortical. Los canales secretores se presentan en ambos órganos en la corteza interna y en el floema secundario, pudiéndose observar la presencia de resinas en el interior de los mismos (Figura 2.12 B).

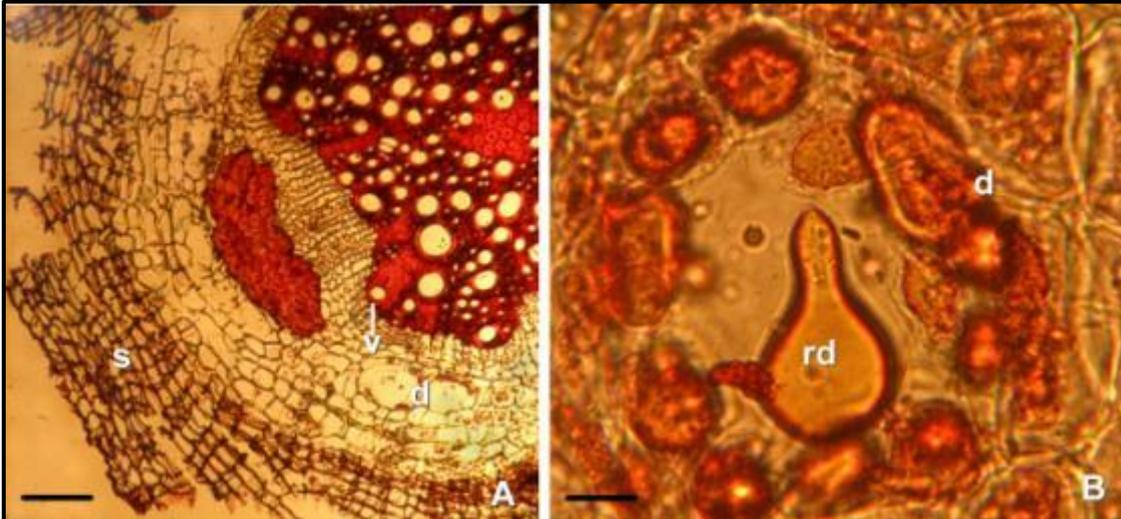


Figura 2.12. Fotomicrografía del corte transversal de raíz con inicio de crecimiento secundario en *F. campestris* (MO). **A:** detalle del desarrollo inicial de los canales resiníferos **-d-** próximos y externos a la endodermis (las flechas indican la posición de la endodermis). Se observa la presencia de súber **-s-** formado en la zona más externa, poco común en raíces. **B:** detalle de un ducto **-d-** con una gota de resina **-rd-** en su interior. Escalas= **A** (110 μm), **B** (75 μm).

✚ ÓRGANOS REPRODUCTIVOS

Capítulos (receptáculo común, flores, filarias y páleas)

En ambas especies, en corte transversal (base del capítulo) y longitudinal radial de los capítulos se observaron tricomas glandulares y conductos (Figura 2.13 A y B).

En corte longitudinal puede notarse la presencia de abundantes tricomas glandulares en filarias y páleas que no se encuentran completamente expandidas (Figura 2.13 A). La mayor densidad de tricomas ocurre en la parte superior de los pétalos (80% del total) de las flores y a lo largo de las venas en filarias y páleas (Tabla 2.1).

Los conductos resiníferos se encuentran distribuidos en todas las brácteas, flores liguladas y tubulosas, y en la base del capítulo o receptáculo común (Figura 2.13 A y B).

En la Tabla 2.2 se muestra la distribución y diámetro de los conductos en los diferentes tallos vegetativos y reproductivos.

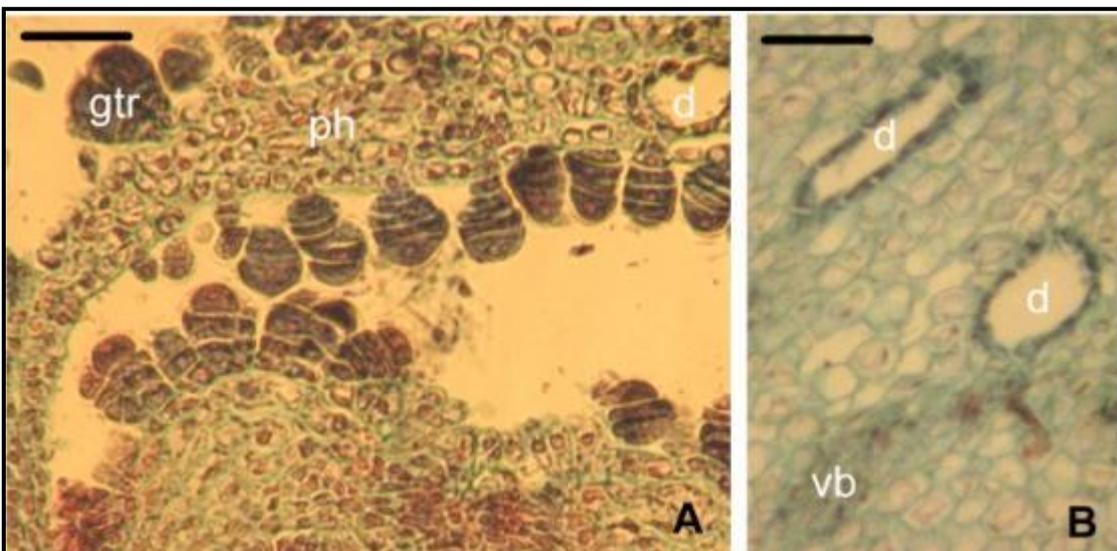


Figura 2.13. Fotomicrografía de órganos reproductivos (MO). **A:** *F. oolepis*. Corte longitudinal del capítulo donde se observa una filaria **-ph-**, tricomas glandulares **-gtr-** y canales **-d-** nótese la abundancia de tricomas

glandulares en ambas epidermis de la filaria y también en la corola de una flor tubulosa. **B**: *F. campestris*, sección transversal de la base del capítulo donde se muestra la presencia de ductos -**d**- próximos al haz vascular -**vb**-. Escalas= **A** (37 μ m), **B** (75 μ m).

2.3.2.2.- Cuantificación de tricomas glandulares, conductos resiníferos en las distintas estructuras y naturaleza de las sustancias secretadas.

Tanto en *F. campestris* como en *F. oolepis*, la autofluorescencia verde (amarillento) brillante observada en los tricomas glandulares, al iluminar los preparados de los distintos órganos con luz azul o UV (MOF), permitió reconocer la presencia de metabolitos secundarios - fenoles y terpenos - (Combrick et al. 2007 -Figura 2.10 D-), por ejemplo en tallo de *F. campestris*. Estos compuestos serían secretados por los tricomas glandulares a través de las células apicales de la cabezuela (descrito en el punto 2.3.2.1- Hojas)

La secreción de los conductos, en cambio, no presenta autofluorescencia. Al ser observados al MO, las sustancias secretadas por las células epiteliales de los ductos presentan una coloración amarillento-anaranjado y una textura compatibles con compuestos de tipo resinoso. (Robinson 1981).

Como fuera mencionado anteriormente, los tricomas glandulares se encuentran presentes en las estructuras foliares (vegetativas y reproductivas) y tallos vegetativos jóvenes estudiados para ambas especies. La densidad de tricomas fue significativamente mayor en las hojas vegetativas respecto a las reproductivas, siendo las primeras ca. 3x (veces mayor que) la densidad observada en las filarias, y ca. 5x la de las corolas (Tabla 2.1). Entre las brácteas también se observaron diferencias significativas, siendo las filarias y páleas las que presentaron mayor densidad promedio. Solo en *F. campestris* se hallaron diferencias entre la cara adaxial y la abaxial en hojas vegetativas completamente expandidas (Tabla 2.1).

Especie	Hojas vegetativas		Brácteas y Flores			
	Cara adaxial	Cara abaxial	Filarias	Páleas	Corola de las flores liguladas	Corola de las flores tubulosas
<i>F. campestris</i>	123 \pm 8 ^{*a}	93 \pm 5 [*]	25 \pm 2 [®]	40 \pm 4 [®]	14 \pm 1 [®]	26 \pm 2 [®]
<i>F. oolepis</i>	95 \pm 3 ^b	85 \pm 4	31 \pm 4 [®]	45 \pm 4 [®]	19 \pm 1 [®]	20 \pm 2

Tabla 2.1. Densidad de tricomas glandulares en hojas vegetativas, en brácteas y flores en *F. campestris* y *F. oolepis*. Los datos corresponden a la media \pm ES; recuentos realizados en 30 campos de 1 mm². Diferencias significativas entre hojas vegetativas (*), entre brácteas y flores (®) y entre especies (a, b).

En relación a los conductos resiníferos, el patrón de distribución entre los distintos órganos y tejidos fue muy similar entre especies (Tabla 2.2). Se encontraron diferencias significativas en la densidad de conductos entre órganos para cada una de las especies, donde los valores menores se observaron en los tallos primarios y los mayores correspondieron a los ubicados en el floema secundario de los tallos secundarios. Valores intermedios se hallaron en corteza de tallo primario y secundario y base de los capítulos.

Los diámetros de los conductos, en cambio, fueron significativamente mayores en la corteza de los tallos secundarios y en la base de los capítulos para ambas especies, seguidos por los del floema secundario y de los tallos primarios (Tabla 2.2). Los valores más altos correspondieron a *F. campestris*. Las diferencias en diámetro entre los

tamaños extremos fue casi 10 veces superior en tallos secundarios de corteza de *F. campestris* comparados con tallos primarios de médula de *F. oolepis* (165,55 vs. 17,55, respectivamente), diferencia muy similar a la encontrada en la densidad de conductos entre ambas especies (ca. 10,4).

Al calcular la superficie que ocupan los conductos en relación al área muestral

($1 \mu\text{m}^2 = 1 \times 10^{-6} \text{ mm}^2$), el patrón guarda una relación estrecha con lo descripto para el diámetro de los conductos, donde la mayor superficie ocupada por éstos correspondió al tallo secundario y a la base de los capítulos. La superficie ocupada por conductos varió entre 2,4 % y 0,025 % para los valores extremos (*F. campestris*-corteza tallo secundario y *F. campestris*-médula, respectivamente). Cabe aclarar que para el cálculo de la superficie de cada conducto, ésta se aproximó a la del círculo, por la similitud con la forma que generalmente presentan. Si bien esta aproximación pudo haber sobreestimado la superficie de los conductos presentes en la corteza (a veces más ovalados), dado que encontramos diferencias de dos órdenes de magnitud, las diferencias debieran seguir manteniéndose.

		Tallo primario		Tallo secundario		Base del capítulo
		Corteza	Médula	Corteza	Floema secundario	
<i>F. campestris</i>	Densidad (Nº/mm ²)	13 ± 0,2a	6 ± 0,3	14 ± 0,8	57 ± 4,6*a	9 ± 1,3a
	Ø (µm)	39,5 ± 2,9	25,6 ± 1,3	165,5 ± 18,6*a	58,9 ± 9,5	131,4 ± 2,1*c
	Sup. (µm ²)	827,6	253,7	23.988,8	3.361,8	13.592,5
<i>F. oolepis</i>	Densidad (Nº/mm ²)	15 ± 0,4*b	5 ± 0,3*	12 ± 1,0*b	45 ± 2*b	35 ± 2,2b
	Ø(µm)	31,3 ± 2,8	17,5 ± 1,8	89,1 ± 7,2*	53,9 ± 3,1	78,6 ± 1,6*d
	Sup. (µm ²)	1.284,6	538,2	6.609,6	2.352,1	4.871,1

Tabla 2.2. Densidad y diámetro de los canales resiníferos en corte transversal de órganos caulinares vegetativos y reproductivos. Se incluye el cálculo de la superficie total ocupada por los canales en secciones de 1 mm². El cálculo de la superficie de cada conducto se aproximó a la del círculo. Los datos representan las medias ± ES (n = 30). Diferencias significativas entre órganos (*) y entre especies (a, b, c y d) - p < 0,05.

2.3.3.- Micorrizas Arbusculares (MA).

2.3.3.1.- Detección y caracterización de MA en *F. campestris* y *F. oolepis*.

En ambas especies se evidenció la presencia de MA en raíces de plantas adultas crecidas en su ambiente natural, con colonización del tipo Arum. En *F. oolepis*, la colonización presentó hifas intra e intercelulares con un diámetro entre 0,18 – 0,7 µm (Figura 2.14 A-B), vesículas intracelulares ovales, de 3,27 – 4,8 µm de diámetro con paredes delgadas, e hifas subtendidas de 0,3 – 0,41 µm de diámetro características del tipo Arum (Figura 2.14 C), y circunvoluciones intracelulares, algunas muy enrolladas (Figura 2.14 D). Las plantas presentaron un porcentaje de colonización MA del 70 %. No se observaron arbuscúlos en ninguna de las muestras analizadas (Tabla 2.3).

En las raíces de la misma especie también se detectaron abundantes hifas septadas de color castaño de 0,14 – 0,41 µm de diámetro y microesclerocios, ambos pertenecientes a "endofitos septados oscuros" (DSE -dark septate endophytes-) (Figura 2.14 A-B).

En *F. campestris*, la presencia de MA fue menos abundante. La colonización presentó hifas intra e intercelulares delgadas de 0,1 - 0,58 µm de diámetro (Figura 2.15

A), con vesículas ovoides terminales de 1,48- 5,03 μm de diámetro con hifas subtendidas (0,1 - 0,4 μm de diámetro) (Figura 2.15 B y D). En algunos sectores se observaron circunvoluciones intracelulares (Figura 2.15 C). Las plantas presentaron un porcentaje de colonización MA del 63.4 % (Tabla 2.3). La presencia de DSE se caracterizó por escasas hifas septadas castañas muy delgadas localizadas intra e intercelularmente (Figura 2.15 A).

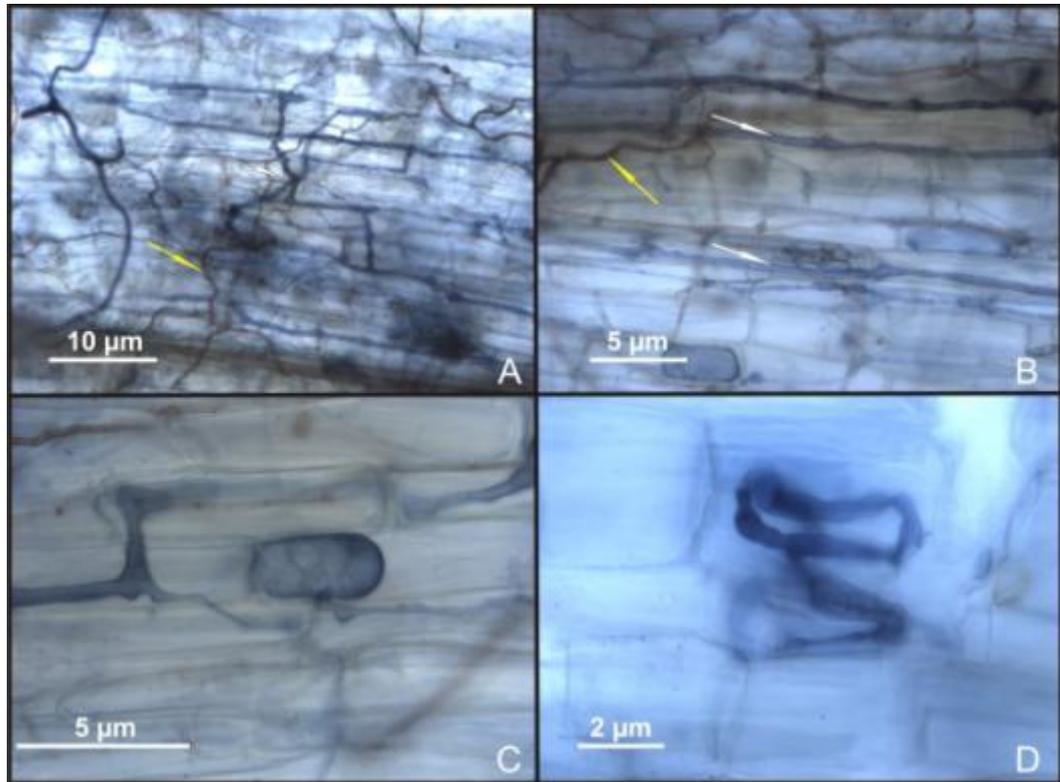


Figura 2.14. Microfotografías en las que se muestra la colonización de raíces de *F. oolepis* por Micorrizas Arbuscular (MA) y "Endofitos Septados Oscuros" (DSE -Dark Septate Endophytes-), (tinción con Azul de Tripán). **A:** hifas de MA de distinto grosor (flecha blanca) e hifas de DSE (flecha amarilla); **B:** detalle de hifas de MA intra e intercelulares (flecha blanca) y de los DSE - hifas castañas (flecha amarilla)- con formación de microesclereocios; **C:** detalle de una vesícula; **D:** Detalle de un rulo.

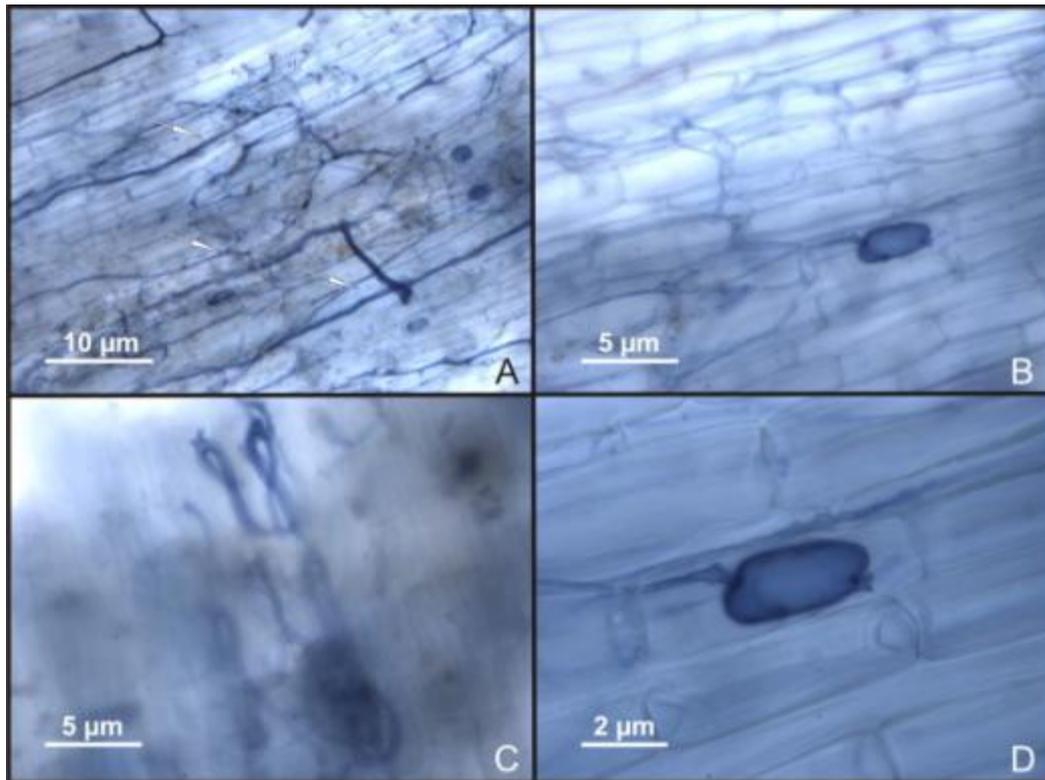


Figura 2.15 Microfotografías en las que se muestra la colonización de raíces de *F. campestris* por Micorrizas Arbuscular (MA) (tinción con Azul de Tripan). **A:** hifas de MA de distinto grosor (flecha blanca); **B:** detalle de hifas intra e intercelulares y de vesícula (flecha) de MA; **C:** detalle de un rulo; **D:** detalle de una vesícula.

Hospedante	% Hifas	% Vesículas	% Arbúsculos	% Rulos	% Total
<i>F. oolepis</i>	50	18	0	1	69
<i>F. campestris</i>	52.3	7.9	0	3.1	63.3

Tabla 2.3. Porcentaje de colonización MA, hifas, vesículas y arbúsculos, en *F. oolepis* y en *F. campestris*.

2.3.3.2.- Efecto de la simbiosis MA sobre el crecimiento de *F. oolepis*.

Las plantas de *F. oolepis* crecidas en sustrato micorrícico presentaron un porcentaje de colonización del 74.5 %, lo cual se vio reflejado en un mayor crecimiento en las plantas micorrizadas (CM) respecto a las que crecieron sin inóculo micorrícico (SM) (Figura 2.16), tal como se describe a continuación.

Luego de 90 días de tratamiento, las plantas crecidas en sustrato micorrícico mostraron mayor altura respecto a las plantas SM (5,59 y 3,86 cm, respectivamente, $p < 0.05$) (Figura 2.16 y Tabla 2.4). El diámetro a la base del tallo también presentó diferencias significativas, siendo un 40 % mayor en las plantas CM que en las SM (1,82 vs. 1,31, respectivamente) (Tabla 2.3). Si bien la longitud de la raíz (medida en sentido vertical) no fue diferente entre plantas CM y SM (Tabla 2.4), en la Figura 2.16 claramente puede observarse que las plantas CM desarrollaron un sistema radical mucho más profuso, con mayor número de ramificaciones que determinaron una arquitectura diferente. El número de hojas tampoco fue diferente entre plantas crecidas con o sin inóculo, las que produjeron ca. 7 hojas/planta. La dinámica de la producción de hojas durante el ensayo (datos no presentados) tampoco difirió entre tratamientos, lo que indicaría que la micorrización no afectó el desarrollo de las plantas.

Las plantas crecidas con sustrato micorrícico produjeron en promedio 2 veces más biomasa total respecto de aquellas crecidas sin inóculo micorrícico (Figura 2.17). La biomasa para las distintas fracciones fue, en todos los casos, significativamente superior

en plantas CM respecto a las SM (entre 1,6 y 2,9 veces mayor). En las plántulas micorrizadas, el mayor peso seco lo presentaron las raíces, seguido por las hojas y por último los tallos, los cuales alcanzaron valores promedios de 0,1, 0,08 y 0,04, g respectivamente. En las plantas controles, el peso seco promedio fue de 0,04, 0,05 y 0,02 g para raíz, hoja y tallo, respectivamente (Figura 2.18). La relación Raíz:Tallo (R/T), una de las variables más empleadas para demostrar el efecto de la simbiosis micorrízica sobre las plantas mostró que, en las plantas SM la R/T fue de 0,57, ca. 6 veces mayor que la encontrada para las plantas CM (0,10). En relación a la forma en que la biomasa total fue particionada entre los distintos órganos, se encontraron diferencias a nivel de hojas (36,5 % CM vs. 45,4 % SM) y raíces (45,5% CM vs. 36,6% SM); los tallos en ambos tratamientos representaron el 18 % de la biomasa total.

	Sin Micorrizas	Con Micorrizas
Longitud de tallo (cm)	3,86 ± 0,24 (a)	5,59 ± 0,23 (b)
Longitud de raíz (cm)	18,7 ± 1,98 (a)	22,30 ± 2,03 (a)
Diámetro a la base del tallo (cm)	1,31 ± 0,07 (a)	1,82 ± 0,08 (b)

Tabla 2.4 Longitud de tallo y raíz, y diámetro a la base del tallo en plantas juveniles de *F. oolepis* crecidas sin y con inóculo micorrízico. Los valores representan la media ± ES de tres ensayos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

2.3.3.3.- Efecto de la simbiosis MA sobre el crecimiento de *F. campestris*.

Los porcentajes de micorrización alcanzados en laboratorio en el caso de *F. campestris* en los tres ensayos fueron muy bajos, lo que impidió determinar el efecto de la simbiosis MA sobre esta especie. Será necesario realizar nuevos estudios para comprobar si las MA poseen algún efecto sobre el crecimiento de esta especie. No obstante, estos resultados, sumados a la menor colonización tanto por MA como por DSE en las raíces cosechadas en plantas creciendo en su ambiente natural, podrían indicar la mayor dificultad para establecer relaciones con organismos simbiotes y/o la menor dependencia simbiótica de esta especie.

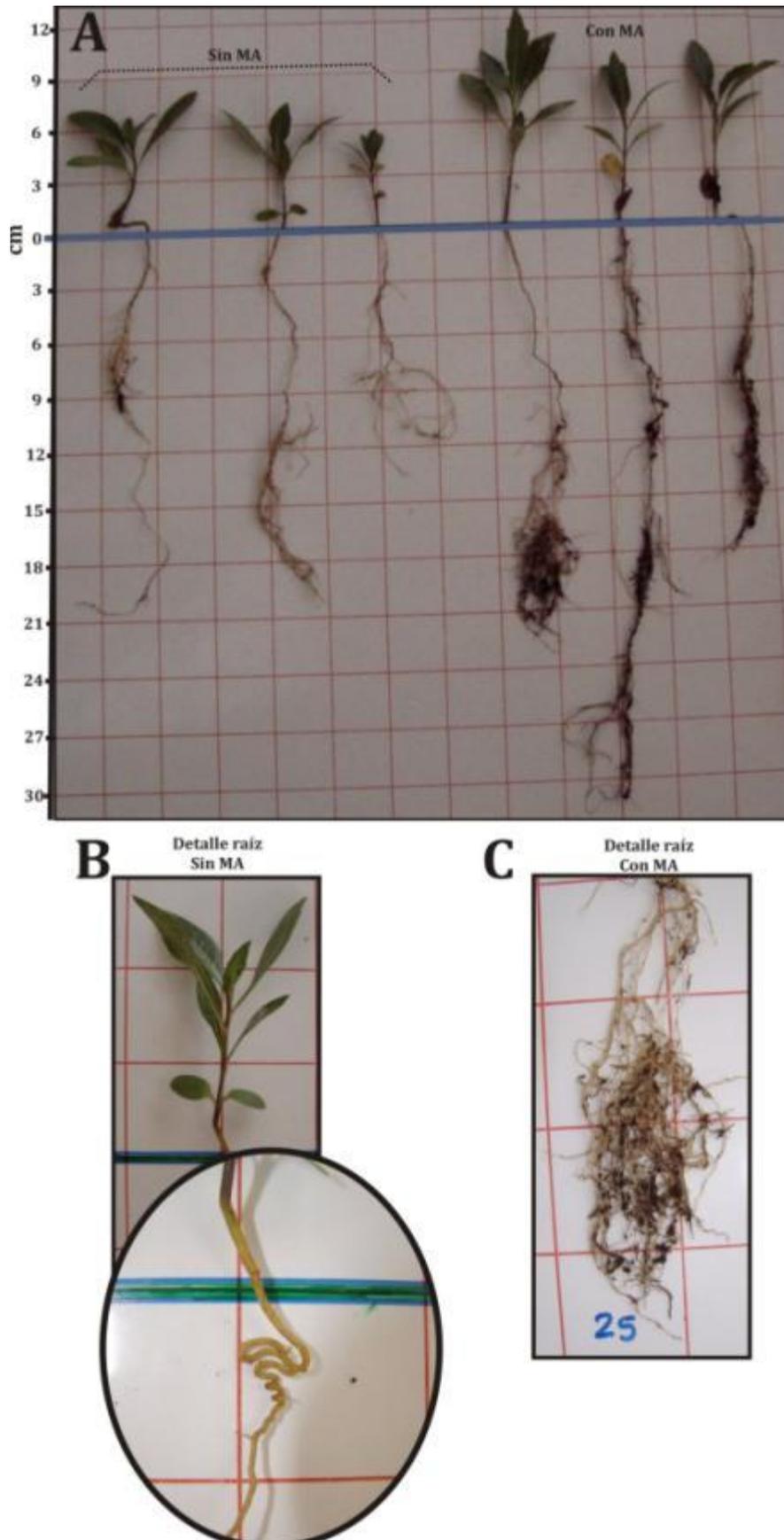


Figura 2.16. Efecto de la simbiosis MA sobre el crecimiento de *F. oolepis*. **A:** Longitud de tallo y de raíz (cm); **B:** detalle de la raíz de una plántula sin micorrizar; **C:** detalle de la raíz de una plántula micorrizada. **Con MA:** plántulas crecidas con inóculo micorrízico arbuscular. **Sin MA:** plántulas crecidas sin inóculo micorrízico arbuscular.

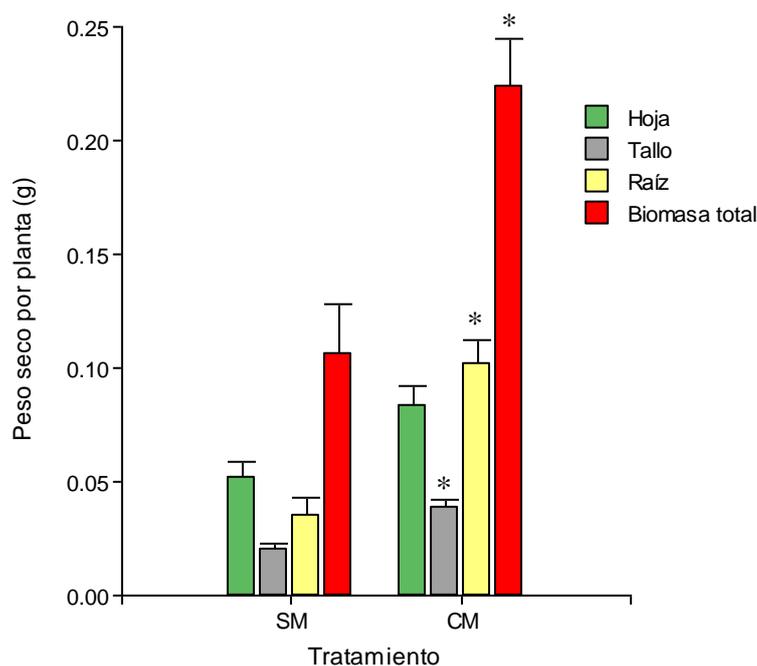


Figura 2.17. Efecto de la simbiosis MA sobre el crecimiento de *F. oolepis*. Las barras representan el peso seco (g) de las distintas fracciones (hoja, tallo y raíz) y la biomasa total por planta en ambos tratamientos. Se representa la media de tres ensayos independientes \pm ES. (*), diferencias significativas, $p < 0,05$. **SM:** Plántulas crecidas sin inóculo micorrízico arbuscular. **CM:** Plántulas crecidas con inóculo micorrízico arbuscular.

2.4.- DISCUSIÓN

En las últimas décadas han surgido distintas aproximaciones al aspecto dinámico e integral del crecimiento de las plantas, que interpretan en forma variada su estructura. Los estudios sobre la arquitectura de las plantas comenzaron por la década de los '70 impulsados por los trabajos de Hallé y Oldeman (1970), que basándose en el estudio de los sistemas de ramificación de árboles tropicales encontraron la relación entre arquitectura y crecimiento, y desarrollaron el marco conceptual para la descripción y clasificación de las plantas (Tourn et al. 1999). La arquitectura de una planta es el resultado del funcionamiento de sus meristemas (Tourn et al. 1999), quedando determinada por el número, tamaño y disposición relativa de sus ejes vegetativos aéreos y subterráneos (Hallé y Oldeman 1970), y por la reorientación activa que estos ejes puedan sufrir en el medio en el cual se desarrollan (Bell 1994).

Las especies estudiadas presentan un vástago principal ortótropo con crecimiento continuo y definido, con ramificaciones vegetativas ortótropas acrotónicas y simpodiales, y con inflorescencias (panículas de capítulos - Rua 1999). Este patrón no coincide con ninguno de los 23 modelos arquitecturales generales descritos por Hallé et al. (1978), que se aplican indistintamente a plantas herbáceas y arbóreas, tanto a tropicales como templadas, de taxones actuales o extintos. Esto es posible ya que la arquitectura es un proceso dinámico. El desarrollo de las reiteraciones produce cambios en la forma de la planta. Estas reiteraciones, a su vez, pueden originarse a partir de tres vías diferentes: de las yemas adventicias del xilopodio; de yemas remanentes a lo largo del eje principal - en ambos casos reiteraciones basitónicas; y las originadas por la

segunda yema axilar en algunos de los vástagos reproductivos, luego de la floración – reiteraciones acrotónicas. Como consecuencia de ello existe lo que se denomina “continuum arquitectural” (Hallé com. pers.), y las variaciones arquitecturales presentes en las especies respecto a los modelos, son la resultante de la interacción entre el patrón intrínseco de las mismas con el ambiente en que crecen, siendo la totipotencia de los meristemas lo que les permite este grado de plasticidad (Bell 1994).

En relación a la exo y endomorfología de *F. campestris* y *F. oolepis* la hipótesis planteaba que, en función a las características del ambiente en que habitan, estas especies presentarían adaptaciones que son comunes con las de otras especies xerófitas. En ambientes xerofíticos, las especies suelen poseer estrategias adaptativas que le permiten superar la época de sequía (Basconsuelo et al. 1997, Bianco et al. 1998), tales como raíces profundas, órganos de almacenamiento subterráneos (raíces tuberosas, xilopodios, rizomas) con abundante parénquima rico en almidón. Los xilopodios, rizomas o coronas (pleicormos leñosos perennes) son estrategias de perpetuación vegetativas propias de estos ecosistemas (Solbrig et al. 1996, Fahn y Cutler 1992) y pueden ser órganos mixtos por su función (absorción y reserva) y por su origen (Rauh 1950): raíz primaria y tallo. Según Troll (1948) y Rauh (1950), éstos pueden originarse por el almacenamiento de sustancias de reserva en la raíz primaria. En el caso de *F. campestris* y *F. oolepis*, la estructura del xilopodio corresponde a la de un órgano mixto, formado por el hipocótilo (incluyendo el nudo cotiledonar) y la raíz. Se trataría de especies hemicriptófitas (*sensu* Raunkiaer 1934) ya que pueden originar yemas de innovación a partir del xilopodio cuya parte superior crece por encima del nivel del suelo. Esas yemas de innovación pueden originar vástagos accesorios –reiteraciones–, que reemplacen parcial o totalmente la parte aérea de la planta frente a eventos de estrés muy severos, o disturbios ambientales tales como incendios. La regeneración de vástagos aéreos a partir de las yemas del xilopodio y ante la presencia de un disturbio, ha sido documentada en muchos arbustos de los campos del Cerrado en Brasil, las zonas rocosas de Sierra de la Ventana y las sabanas mesopotámicas (Rizzini 1965, Ponce 1986, Barrera y Rivera 1993, Galíndez et al. 2009). En las Sierras Chicas de Córdoba, los incendios de intensidad variable son un disturbio muy frecuente (2-6 años), en esta zona la mayor parte de las especies que componen las distintas comunidades poseen estructuras adaptativas que aseguran su perpetuación (Verzino et al. 2005). Junto a las comunidades de *Flourensia*, hallamos especies pertenecientes a los géneros *Adesmia*, *Baccharis* (Sección *Cylindricae*), *Desmanthus*, *Eupatorium*, *Galactia*, *Grindelia*, *Stevia*, entre otros, que poseen xilopodios como estructuras de perennantes (Bianco et al. 2001, Giuliano 2001, Galíndez et al. 2009, Georgis et al. 2011). En estas comunidades es común observar las cicatrices del fuego en los xilopodios de estas especies, que pueden restablecer su parte aérea por completo a expensas de los rebrotes producidos por el xilopodio. Este tipo de estrategia adaptativa es clave para la persistencia de *Flourensia* en su hábitat natural. Así mismo, la capacidad de desarrollar yemas múltiples –seriales– Tomlinson (1978) en la base de las panículas de capítulos que se secan y caen, luego de la fructificación, constituye otra valiosa adaptación, que permite la producción de vástagos vegetativos cuando las condiciones ambientales son desfavorables pero no extremas (fuego).

El análisis de la endomorfología permitió identificar algunas características propias de especies xerofíticas, como la presencia en hojas de un mesófilo isolateral, clorénquima en empalizada hacia ambas epidermis y fibras por debajo de la epidermis. En los tallos con crecimiento secundario encontramos abundantes fibras con aspecto homogéneo, y la presencia de esclerénquima en los casquetes del floema. En algunos casos, en particular en *F. campestris*, observamos la presencia de una hipodermis con 2-

3 capas de células, que resulta característica en especies de ambientes sometidos a estrés abiótico. En las raíces con crecimiento secundario también se observó la presencia de súber de origen superficial y abundantes fibras. El escaso número de capas de células corticales encontrado (2-4) reduciría la resistencia al flujo del agua en las raíces, disminuyendo el recorrido hasta el sistema de conducción (Esau 1965, Fahn y Cutler 1992).

El xilema con escasos vasos y abundante presencia de fibras ha sido clasificado por Carlquist (1960) como característico de especies xerofíticas. Las mediciones realizadas sobre los vasos xilemáticos tanto en tallos primarios como en secundarios, mostraron que ambas especies poseen vasos con diámetros muy por debajo de 30 μm , lo que le conferiría resistencia a embolias originadas por muy bajas temperaturas, que producen congelamiento (Davis et al. 1999, Durante et al. 2010). Estas embolias son interrupciones del flujo xilemático que se producen por el congelamiento de su contenido, más específicamente los gases disueltos dejan de ser solubles en hielo, por lo que se congelan como burbujas. Al descongelarse, y restablecerse la tensión en el xilema, las burbujas crecen y producen la cavitación (Lambers et al. 1998). Si bien el diámetro de los vasos xilemáticos no está relacionado con la vulnerabilidad a las embolias producidas por sequía (Sperry 1995), éste sería un carácter adaptativo en los ambientes en los que crecen *Flourensia* sp., en los que pueden registrarse amplitudes térmicas importantes, y temperaturas inferiores a 0 °C. En este sentido se ha documentado que en plantas leñosas de zonas templadas, la mayor parte de las embolias se produce en respuesta a ciclos de congelamiento y descongelamiento durante el invierno más que como respuesta a la sequía (Sperry 1995).

Una de las características típicas de especies de ambientes áridos, es la de presentar estructuras secretoras (Fahn y Cutler 1992), las que cumplen diversas funciones en las plantas. *F. campestris* y *F. oolepis* presentan dos tipos de estructuras secretoras: los tricomas glandulares - peltados y con cabezuela pluricelular biseriada de contenido denso- y los conductos secretores. Los tricomas glandulares se encuentran en todas las hojas vegetativas y reproductivas. Las hojas poseen la mayor densidad de tricomas glandulares (2-3 veces más que otros órganos), encontrándose mayormente distribuidos en la caras adaxial en *F. campestris* y preferentemente asociados a los nervios en ambas especies. En estudios previos, Delbon et al. (2007) documentaron la existencia de tricomas glandulares en hojas de estas especies con un patrón de distribución muy similar. Sin embargo, cabe señalar que hasta el presente no se había detectado la presencia de estos tricomas en las brácteas y flores, siendo nuestros resultados los primeros en reportarlos. En las corolas de las flores liguladas y tubulosas también se observaron abundantes tricomas asociados a los nervios y concentrados en el tercio superior de las mismas. En tallos jóvenes se pudo distinguir la presencia de tricomas, aunque en densidades muy bajas.

Nuestros estudios son los primeros en documentar la ultraestructura de estos tricomas, y la forma en que las sustancias que éstos producen son excretadas al exterior. Las células de la cabezuela de los tricomas en el estadio de activa secreción se caracterizan por poseer un citoplasma denso, mitocondrias próximas al plasmalema, y abundantes cloroplastos, leucoplastos, vacuolas con glóbulos lipídicos, y abundante retículo endoplasmático rugoso y vesículas dictiosómicas. Estos componentes son típicos en la mayoría de los tricomas glandulares que producen y secretan compuestos, en su mayor parte de tipo lipofílico (Fahn 2000, Bartoli et al. 2011). En relación a la forma en que las sustancias son excretadas, se observaron diferencias entre ambas especies. En el caso de *F. campestris*, las sustancias producidas se acumulan transitoriamente en los espacios interfibrilares de la pared celular. Esta acumulación

promueve la separación de la cutícula permitiendo que las sustancias se acumulen en la cámara subcuticular, hasta que la cutícula se rompe, y las sustancias son secretadas al exterior. En *F. oolepis*, en cambio, la liberación al exterior de las sustancias acumuladas en la cámara subcuticular se produce a través de la cutícula laxa, sin presentar poros o roturas. Si bien la exocitosis la realizan las células apicales de las cabezuelas, el tricoma seguiría produciendo sustancias activamente mientras las restantes células (del pie) permanezcan funcionales (Fahn 2000). A su vez, la observación de los preparados bajo luz UV, permitió asociar los compuestos producidos por los tricomas con el grupo de los fenil propanoides y terpenoides, evidenciado por una típica autofluorescencia verde amarillenta (Combrick et al. 2007). Esta coloración fue observada tanto en los pelos como sobre la superficie de la cutícula, donde se distribuirían los compuestos luego de ser excretados.

Los conductos secretores o conductos resiníferos en ambas especies se encuentran distribuidos en todos los órganos de las plantas, tanto vegetativos como reproductivos. Estos canales se originan por procesos esquizógenos y están formados por un epitelio secretor unistratificado, una capa subepitelial y una vaina parenquimática. La existencia de esta vaina parenquimática podría cumplir la función de impedir que las sustancias producidas por los conductos se trasladen a otras células / tejidos, compartimentalizando a las mismas, lo que sugeriría la naturaleza fitotóxica de los compuestos producidos en los conductos. Si bien en corte transversal los conductos se ven redondeados o ligeramente ovalados, es importante destacar que éstos recorren los órganos en sentido longitudinal (Sulborska 2007). En tallos secundarios de *F. oolepis* los conductos de la corteza llegan a medir 1.200 μm , y ca. 275 μm los del floema secundario. En las raíces, dichos canales se originan próximos al floema en posición extra-endodérmica. Estos fueron denominados “conductos endodérmicos” por Tetley (1925) y resultan comunes a otras especies dentro de la familia de las Asteraceae (Metcalf y Chalk 1950). La presencia de los conductos próximos al floema también ha sido documentada en otras especies de Asteraceae, a los que se les ha asignado un rol en la defensa contra la herbivoría (Appezato-da-Gloria et al. 2008).

En coníferas y otras especies resiníferas, los conductos se encuentran localizados en los radios parenquimáticos del xilema (Fahn 1988), en cambio en la familia de las Compuestas (Asteraceae) sólo unas pocas especies presentan conductos secretores en los radios (e.g., *Ambrosia hispida*, *Artemisia tridentata*, *Hymenoclea slasola*) (Carlquist 1966). En *Flourensia* spp., la mayor densidad de conductos se encontró en el floema secundario (no en los radios floemáticos) de tallos secundarios, mientras que los conductos de mayor diámetro se observaron en la corteza de los tallos secundarios y en la base de los capítulos. Con la migración del felógeno y la aparición de un nuevo felógeno interno, se produce el colapso de los tejidos que hasta ese momento se encontraban vivos. Como el felógeno produce súber hacia el exterior, los tejidos exteriores al felógeno, quedan aislados y mueren. Por ende, la localización de los conductos en el floema secundario, próximos al súber, facilitarían la excreción de las sustancias producidas hacia el exterior a través de las lenticelas. En plantas creciendo en poblaciones naturales, es muy frecuente encontrar resinas sobre la superficie de los tallos, que han sido excretadas al exterior y aparecen en forma de gota con distinta coloración (amarillenta a ferruginosa) y consistencia (más o menos viscosa), probablemente asociado al grado de oxidación que presenten los compuestos.

Las características propias de los conductos secretores, como la forma, localización, composición química y coloración de las resinas, ha sido empleado en estudios filogenéticos. Robinson (1981) utilizó los caracteres de los conductos de las piezas florales, junto con otros caracteres morfológicos para definir y delimitar las subtribus de

la tribu Helianthea incluyendo el género *Flourensia* en la subtribu Ecliptinae. Carlquist (1966), en una extensa revisión de la anatomía de las maderas de Compuestas, menciona que es común encontrar depósitos de materiales de tipo resinoso en esta familia, que en general se presentan como gotas diminutas en el lumen celular de uno o más tipos de células. En algunas de las especies estos depósitos son suficientemente abundantes como para ocluir vasos, fibras o células parenquimáticas.

En relación a la capacidad de estas especies de producir simbiosis con organismos del suelo, las observaciones a partir de material recolectado en ambiente natural, permitieron documentar que *Flourensia* efectivamente forma simbiosis con microorganismos del suelo. Aún cuando el grado de colonización fue mayor en *F. oolepis*, ambas especies presentaron simbiosis con micorrizas arbusculares (MA). Además de la colonización por MA, las raíces de ambas especies presentaron endofitos septados oscuros (DSE). Judd et al. (2002) en una extensa revisión de familias representadas en todo el mundo, señala que Asteraceae constituye la familia con mayor número de especies donde se ha descrito colonización por MA; aunque también existen trabajos que han citado a las *Asteraceae* como una familia no-micorrícica (Harley y Harley, 1987 a,b). En un estudio de especies que habitan el Bosque del Serrano, Fracchia et al. (2009) encontraron que la simbiosis con MA de tipo Arum era la más difundida, estando presente en el 89 % de las especies, y en el 100 % de las *Asteraceae*. Resultados similares respecto al grado de simbiosis con MA también han sido documentados en otras comunidades (Dhillion et al. 1995, O'Connor et al. 2001, Fontanela et al. 2001, Canmargo-Ricalde et al. 2003). O'Connor et al. (2001) hallaron que el tipo Arum estaba presente en especies herbáceas que crecen en el desierto de Australia, con elevada heliofanía, sugiriendo que la colonización MA de tipo Arum podría estar más difundida en ambientes áridos.

Los resultados de los ensayos controlados mostraron claramente que las plántulas de *F. oolepis* crecidas con inóculo micorrícico produjeron en promedio 2 veces más biomasa que las sin inóculo micorrícico. Las plantas micorrizadas presentaron mayor biomasa en todos los órganos (hojas, tallo y raíz), y la relación raíz: tallo fue 2 x. El grado de dependencia micorrícica (Plenchette et al. 1983), calculado como la razón entre la biomasa total de plantas micorrizadas y la de las plantas no micorrizadas fue muy alto, demostrando que al menos en *F. oolepis* la simbiosis MA representa una ventaja adaptativa, al menos durante los primeros meses de crecimiento. Como ha sido mencionado por diversos autores, el grado de colonización y dependencia micorrícica puede variar aún dentro de una misma especie que habita en distintos ambientes (Brundett 1991), por lo que no sería raro encontrar que *F. campestris* pueda presentar otra respuesta.

La presencia de DSE ha sido frecuentemente observada en *Asteraceae* y *Poaceae* (Vare et al. 1992, Cázares et al. 2005, Menoyo et al. 2007, Zhang et al. 2011). La presencia conjunta de MA y DSE, como ocurre en ambas especies de *Flourensia*, ha sido documentado previamente para otras comunidades en las que se encuentran presentes *Asteraceae* (Fracchia et al. 2009, Zhang et al. 2011).

Querejeta et al. (2006) observó que el crecimiento a largo plazo de acebuche (*Olea europae*) y de espino negro (*Rhamnus lycioides*), así como su estatus hídrico y nutricional, mejoraba en plantas inoculadas con especies de *Glomus* procedente de zonas semiáridas, en relación a las plantas inoculadas con *Glomus* que no estaban adaptados a la sequía. A su vez, Marulanda et al. (2007) demostró que las plantas de lavanda (*Lavandula spica*) inoculadas con dos especies diferentes de *Glomus sp.* (*G. intraradices* y *G. mosseae*) procedentes de ecosistemas áridos, producían mayor biomasa de raíces y eran más eficientes en la absorción de N y K que en las plantas

inoculadas con la misma especie de *Glomus* procedente de zonas de ecosistemas más xéricos. La prevalencia de colonización MA en regiones semiáridas, sugiere que este tipo de asociación jugaría un rol importante en estos ecosistemas, aumentando la eficiencia en el uso del agua y el fitness general de las plantas (Mandyam y Jumpponen 2005, Muthukumar et al. 2006).

La colonización micorrícica en condiciones naturales se encuentran influenciadas por diversos factores dentro de los cuales se incluyen: a) las condiciones ambientales, tales como humedad y temperatura del suelo; b) la fenología y el estadio fisiológico de las plantas hospedantes y c) la tasa de crecimiento radical y fúngico (Brundrett 2002, Cleveland *et al.* 2003, 2004, 2007). Ramos-Zapata et al. (2006) han demostrado que los mayores porcentajes de colonización micorrícica, en condiciones naturales para cuatro edades definidas de *Desmoncus orthacanthus* Martius, se presentaron en las épocas de mayor precipitación, en comparación con las épocas de menor o sin precipitación. Con frecuencia, se considera que un indicador preciso de la colonización micorrícica total es la presencia de arbuscúlos (McGonigle et al. 1990, Gange y Ayres 1999), a pesar de que éstas son estructuras muy efímeras, cuya duración puede ser de 3 a 7 días (Mohammad et al. 1998). En *Annona diversifolia* Saff. los mayores porcentajes de arbuscúlos coinciden con las épocas de mayor precipitación, con una marcada reducción en las épocas sin precipitación. De hecho, en la época en la cual existió una defoliación completa no se detectó presencia de arbuscúlos (Cortes-Sarabia et al. 2009). *F. campestris* y *F. oolepis*, crecidas en ambientes naturales, se caracterizaron por una ausencia de arbuscúlos en los estadios de las plantas estudiadas y en la época muestreada, coincidentes con el momento de cese de crecimiento y el período sin precipitaciones. Debido a que los arbuscúlos son estructuras que están involucradas directamente en la traslocación nutrimental de la interfase planta-hongo (Smith y Read, 1997), la ausencia de arbuscúlos en la época sin precipitación podría ser indicador entonces de una ausencia de traslocación substancial de N y P del suelo a *F. campestris* y *F. oolepis*, vía MA. Otro factor que pudo influir en la colonización micorrícica, en términos de arbuscúlos y vesículas, es la temperatura de los meses muestreados, ya que las temperaturas disminuyen en las áreas muestreadas en esa fecha, concordando con la ausencia de arbuscúlos.

2.4.- CONCLUSIÓN.

Los resultados de los estudios arquitecturales, exo- y endomorfológicos realizados en *F. campestris* y *F. oolepis* han demostrado que éstas comparten características propias de especies adaptadas a condiciones xeromórficas. Entre las características más salientes podemos mencionar la presencia de: estructuras perennantes como el xilopodio, estructuras secretoras, tricomas y conductos resiníferos, y vasos xilemáticos resistentes a embolias por congelamiento. Estas características le otorgarían, a ambas especies, ventajas adaptativas para su supervivencia en los ambientes que habitan.

En relación a la capacidad de generar simbiosis con micorrizas arbusculares y endofitos septados oscuros, ambas especies presentaron colonización simultánea. Como se ha sugerido para otros ecosistemas áridos, este tipo de asociaciones serían de vital importancia, aumentando la competitividad de estas especies en las comunidades de las que forman parte.

Capítulo 3

Adaptaciones funcionales en *F. campestris* y *F. oolepis* que les facilitan su persistencia en ambientes naturales.

3.1.- INTRODUCCIÓN

El crecimiento es ciertamente uno de los procesos más importantes cuando se trata de predecir las respuestas de las plantas al ambiente. Como mencionamos en el capítulo anterior, la combinación de los tipos de módulos presentes en una planta determina diferentes patrones estructurales y conforma el sistema de vástagos (Barlow 1994), lo cual define la **forma de crecimiento** de una planta. Se entiende por **forma de crecimiento** al complejo de caracteres vegetativos y reproductivos genéticamente constantes, que varían sólo dentro de un rango específico de plasticidad fenotípica (Meusel 1952, 1970). El estudio de las formas de crecimiento es comparativo y va unido al análisis de las interacciones con el hábitat, tomando en cuenta las etapas sucesivas que llevan a la construcción del cuerpo de la planta desde la germinación (Meusel 1952), en definitiva, refleja la adaptación local y temporal de la planta a factores abióticos (Meusel 1952, 1970). El análisis de la forma de crecimiento, contempla el estudio detallado de la planta (Meusel et al. 1977), ya que sólo a través de una concepción integral de las partes vegetativas y reproductivas se puede tener una idea completa de su estructura (Rua y Weberling 1998).

Al considerar los patrones generales de la historia de vida de una planta y sus consecuencias energéticas, es necesario hablar de la compleja relación que existe entre crecimiento y reproducción, ya que para todo organismo existe un costo de vida básico, generalmente denominado metabolismo basal o de mantenimiento (Clarke 1987). El metabolismo basal o de mantenimiento comprende todos los procesos químicos que intervienen en forma directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción de las plantas. Son todos aquellos procesos químicos involucrados en el metabolismo primario de las plantas como la fotosíntesis, la respiración, el transporte de solutos, la translocación, la síntesis de proteínas, la asimilación de nutrientes, la diferenciación de tejidos, y en general la formación de carbohidratos, lípidos y proteínas que intervienen en estos procesos o son parte estructural de las plantas (Taiz y Zeiger 2006). El **crecimiento** puede definirse entonces como el incremento en la masa seca, volumen, longitud, o área, que resulta de la división, la expansión y diferenciación de las células. Es por ello que la **tasa de crecimiento** de una planta es el resultado de su genética y del medio ambiente en el que crece. En dicho caso, las plantas son el resultado de la selección natural, lo que da lugar a genotipos con características diferentes que les permiten sobrevivir en un hábitat determinado. Este conjunto de rasgos constituye una "estrategia" o capacidad para desempeñarse eficazmente en un contexto ecológico y evolutivo específico (Lambers et al. 2008).

Una respuesta generalizada de las plantas frente a condiciones subóptimas o limitantes de algún factor, es la reducción de la tasa de crecimiento y cambios en la distribución de recursos de forma de minimizar dicha limitación (Chapin et al. 1987). Las plantas invierten sus recursos de forma diferente entre los órganos con función de captación de luz y asimilación de dióxido de carbono (hojas), de captación de agua y nutrientes minerales (raíces) y de sostén (tallos). La morfología funcional, y en particular, la asignación de biomasa hacia los diferentes órganos de la planta presenta una amplia variación en relación al desarrollo ontogenético. Así, las plántulas de las especies leñosas tienen una gran proporción de biomasa foliar (> al 40% del peso total), comparable a la de plantas herbáceas, mientras que en los arbustos y árboles adultos la mayor parte de la biomasa (70-80%) se encuentra en los tallos, ramas y tronco (Poorter y Nagel 2000). Existe por lo tanto un compromiso en las plantas entre la asignación de biomasa a hojas, lo que permitiría una mayor capacidad de captación de luz y dióxido de carbono, resultando en una mayor tasa de crecimiento, y una mayor asignación de biomasa a las raíces, mejorando la captura de agua y nutrientes minerales del suelo, pero

a expensas de un menor crecimiento. Desde el punto de vista ecológico, una planta con mayor proporción de biomasa en raíz tendría un crecimiento más lento, pero tendría claras ventajas adaptativas en ambientes donde los recursos del suelo (agua y nutrientes) son limitantes, aumentando su supervivencia. En una comparación entre especies leñosas típicas de bosques templados y especies de bosques mediterráneos cultivadas en las mismas condiciones, se comprobó que las especies mediterráneas presentaban menor tasa de crecimiento y destinaban una proporción mayor de biomasa a las raíces. Este patrón de crecimiento y asignación de recursos fueron poco plásticos, sugiriendo una clara adaptación a su medio ambiente original caracterizado por estrés hídricos severos y suelos con baja fertilidad (Castro-Diez 2002).

En ecosistemas que presentan alto grado de disturbios o de estrés ambiental, el sistema de reproducción juega un papel fundamental en la perpetuación de las especies. En estos ambientes podemos hallar plantas que dependen exclusivamente de la reproducción sexual y las que lo hacen sólo por vía vegetativa (Moreno y Oechel 1994). En muchas especies, las semillas juegan un rol importante en la recuperación y mantenimiento de las poblaciones naturales, fundamentales en la colonización de nuevas áreas y el mantenimiento de la diversidad genética. La producción de semillas, las adaptaciones para la dispersión, el estado fisiológico al momento de dispersión (viabilidad, grado de dormición), su dinámica temporal y las señales ambientales que disparan la germinación, constituyen características de importancia a la hora de predecir la participación de la vía sexual en la persistencia de las poblaciones (Baskin y Baskin 1998). En ambientes en los que la floración es infrecuente y los eventos de establecimiento son bajos, la reproducción vegetativa se halla bien desarrollada (Shaver et al. 1979, Chapin et al. 1980). Claramente este es un mecanismo efectivo para mantener un determinado genotipo en condiciones donde la reproducción sexual es un evento raro. La capacidad de translocar recursos entre vástagos que se encuentran conectados permitiría aumentar el éxito de estas especies en ambientes donde la distribución de recursos (e.g., agua, nutrientes) resulta heterogénea (Steufer et al. 1996).

Estos tipos de adaptaciones son frecuentes en especies que habitan el bosque serrano en Córdoba (Luti et al. 1979, Bertrán de Solís 1986), donde el establecimiento de las semillas suele ser dificultoso, siendo la reproducción vegetativa una adaptación frecuente presente en varios grupos taxonómicos (Shaver et al. 1979, Mc Auliffe et al. 2007). Este mecanismo incluye la producción de nuevos tallos, que pueden crecer desde la base del individuo (rebrotos) o a partir de rizomas o estolones. Este tipo de adaptación también es característico de plantas que crecen en ambientes sometidos a fuegos periódicos (Keeley y Zedler 1978, Zedler et al. 1983, Keeley 1992), donde el costo de la reproducción sexual es mucho mayor que el de la producción de vástagos vegetativos (Chapin et al. 1980).

Por otra parte, los recursos que adquiere la planta debe asignarlos a una de tres funciones básicas claves para su mantenimiento: el crecimiento, la defensa y la reproducción. Según postula el conocido Principio de Asignación de los recursos (Levins 1968), en sistemas con limitaciones de recursos, la asignación de éstos a cualquiera de las funciones competirá con las restantes. En extensas revisiones de casos de estudio, Harper (1977) y Wilson y Burley (1983) encontraron que como consecuencia del cambio en la asignación interna de los recursos, la producción de frutos está correlacionada con una reducción en el crecimiento vegetativo, o la disminución en la producción de frutos en los años siguientes. En este sentido es importante conocer cómo las plantas asignan los recursos entre las distintas funciones, cuál es el costo de la reproducción sexual en relación a el crecimiento vegetativo, si los factores ambientales modifican el costo reproductivo (Obeso 1993, Syrjanen y Lethila

1993, Obeso 2002), y si existen mecanismos mediante los cuales se puedan compensar los costos asociados a la reproducción. Entre estos mecanismos se pueden citar el crecimiento compensatorio y aumento o mayor eficiencia fotosintética, fotosíntesis en las estructuras reproductivas, la disponibilidad de meristemas y la arquitectura de las plantas, el momento en que se invierte en crecimiento y reproducción (si hay solapamiento o se produce en distintas épocas), y la reabsorción de nutrientes desde estructuras senescentes.

El establecimiento de plántulas a partir de semillas dependerá de la disponibilidad de propágulos (producción anual y mantenimiento de la viabilidad), de las condiciones necesarias para su germinación, y de los factores que afectan la supervivencia de las plántulas. Es por ello que la reproducción sexual sería importante en la colonización de nuevas áreas o en la recolonización luego de disturbios severos, y dependiendo del tipo de fecundación, del mantenimiento de la variabilidad genética y/o la perpetuación de individuos con un alto grado de ajuste con el ambiente.

En el caso de *F. campestris* y *F. oolepis* no existen antecedentes en los que se hayan estudiado las adaptaciones mencionadas en relación con la persistencia de estas especies en su ambiente natural. En el Bosque Serrano, donde crecen ambas especies, los ambientes se caracterizan por un régimen de precipitaciones estacional, con amplia variación interanual, largos períodos de sequía, amplitudes térmicas importantes con elevadas temperaturas e irradiación en la época primavera-verano y baja disponibilidad de nutrientes y de distribución heterogénea.

En relación a estas características ambientales, la hipótesis plantea que en estos ambientes con altas irradiancias, suelos pobres en nutrientes y baja disponibilidad hídrica, la reproducción vegetativa a partir de estructuras perennantes sería la forma de perpetuación más efectiva en ambientes ya colonizados, y la reproducción sexual mantendría la variabilidad genética, permitiendo la expansión de las poblaciones actuales y la colonización de nuevas áreas. La germinación de semillas estaría regulada principalmente por factores ambientales, siendo las lluvias estacionales (fines de primavera-verano) y la temperatura, los principales disparadores de la germinación. Asimismo, la viabilidad de las semillas debería mantenerse al menos por un año para poder responder a las condiciones ambientales favorables en la próxima estación de crecimiento.

Cuestiones a abordar en el capítulo:

¿Cuáles son las estrategias reproductivas y qué relación guardan con el ambiente en que crecen? ¿Cómo se asignan los recursos entre la producción de vástagos vegetativos y reproductivos? ¿Cuál es el éxito reproductivo en estas especies? ¿Cuáles son los requerimientos para la germinación de semillas y cómo se relacionan con los factores ambientales que prevalecen en su ambiente natural?

Para responder estos interrogantes se realizaron:

- a) Una combinación de estudios en poblaciones naturales de *F. campestris* y *F. oolepis*, para determinar estrategias, la asignación de recursos entre crecimiento vegetativo y reproductivo y el éxito reproductivo de las especies.
- b) Ensayos de laboratorio, bajo condiciones controladas, para determinar los requerimientos para la germinación de semillas.
- c) Análisis de la relación de estas variables con los factores ambientales a que se hallan expuestas.

3.2.- MATERIALES Y MÉTODOS.

3.2.1.- Material Vegetal

3.2.1.1 Área de Muestreo

El material vegetal de *F. oolepis* fue recolectado en marzo de 2004 y de 2005 en la zona denominada frente dique frente al dique “El Cajón” (Figura 1.3, Capítulo 1). Mientras que, el material de *F. campestris*, se cosechó en marzo de 2008 y de 2009 en la zona denominada “El Dragón” (Figura 1.3, Capítulo 1). La recolección de semillas se realizó en los mismos sitios durante marzo-abril de 2003, 2004, 2005 y 2006.

De cada población, se confeccionaron ejemplares de herbario que fueron depositados en el Herbario "Gaspar Xuárez" de la Facultad de Agronomía de la UBA (BAA 26.498 *F. campestris* y BAA 26.499 *F. oolepis*)

3.2.1.2 Muestreo, procesamiento y almacenaje

Para ambas especies, en cada sitio, se seleccionaron al azar 15 individuos adultos, y se identificaron con placas de aluminio numeradas. El material vegetal fue recolectado al finalizar la etapa de llenado de grano y antes del comienzo de la dispersión (marzo), en dos años sucesivos: 2004-2005 (FO) y 2008-2009 (FC). Para los análisis de crecimiento y partición de recursos se seleccionaron reiteraciones vegetativas y reproductivas en cada individuo, y se cosecharon un total 5 módulos reproductivos (MR) y 5 vegetativos (MV) (Figura 3.1). Cada módulo se cortó a nivel axilar, identificando la porción correspondiente al crecimiento del año y aquella de años anteriores. La totalidad del material vegetal cosechado en cada área fue secado en cámara a temperatura ≤ 30 °C, ya que sería luego aprovechado para los ensayos de bioactividad e identificación de aleloquímicos (ver Capítulos 4 y 5). Una vez seco, el material proveniente de cada módulo fue separado en los distintos órganos, y almacenados en ambiente oscuro y seco hasta su procesamiento.

Para los estudios de germinación, entre marzo y abril de cada año (*F. campestris*: 2003-2004, 2004-2005, 2005-2006; *F. oolepis*: 2002-2003, 2003-2004, 2004-2005, 2005-2006) se cosecharon semillas de individuos seleccionados al azar dentro de cada población, realizando un pool con todas las muestras. En el laboratorio, se separaron las semillas de otros restos vegetales (páleas y filarias), y la semilla limpia se almacenó en cámara a 20 °C en envases de vidrio conteniendo sílica gel.

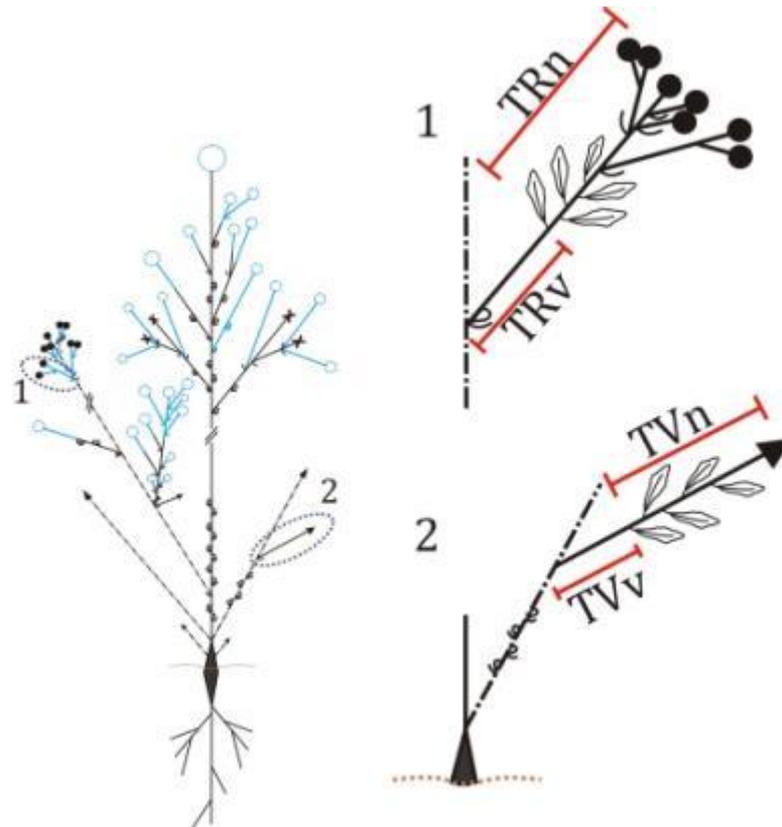


Figura 3.1 Representación esquemática de módulos reproductivos (1) y vegetativos (2) de *F. campestris* y *F. oolepis*. **TRn**: Tallo reproductivo crecimiento del año. **TRv**: Tallo reproductivo crecimiento del año anterior. **TVn**: Tallo vegetativo crecimiento del año. **TVv**: Tallo vegetativo crecimiento del año anterior.

3.2.3. Determinación del crecimiento y asignación de recursos en módulos vegetativos y reproductivos.

Como se mencionó más arriba, para todos los individuos seleccionados dentro de una población ($N=15$) se cosecharon 5 MV (o módulos vegetativos) y 5 MR (ó reproductivos), identificando cada uno de ellos. En cada módulo vegetativo y reproductivo se identificó la porción correspondiente al crecimiento del año, y aquella originada en años previos (1-2 años). Sobre cada una de estas porciones se midió: la longitud y el diámetro a la base del tallo, se contó el número de hojas, y se obtuvo luego el peso seco de cada fracción. Los análisis para este trabajo se realizaron exclusivamente sobre el material correspondiente al crecimiento del año.

En los módulos reproductivos, además de las variables mencionadas, se hizo el recuento del N° total de capítulos por inflorescencia, y en 5 submuestras de capítulos se determinó: el N° de semillas/capítulo, el peso promedio por semilla, el peso del capítulo (pedúnculo + receptáculo + semillas) y el peso para cada una de estas fracciones.

Se utilizaron distintas relaciones para caracterizar la asignación de recursos dentro y entre los MV y MR, el crecimiento de cada fracción, y el esfuerzo reproductivo (i.e., biomasa de capítulos/biomasa total del MR, biomasa del MR/biomasa del MV, longitud del MR/longitud MV (Suzuki 2000)).

Asimismo se determinó el peso foliar específico (specific leaf mass - SLM) para hojas pertenecientes a los MV y MR, en hojas que estaban verdes (activas), y en aquellas que ya se encontraban senescentes en la planta al momento de cosecha.

Se realizaron pruebas de viabilidad obteniendo el número de semillas viables sobre el total de semillas mediante el Test de Tetrazolio (Copeland y Mc Donald 1985).

3.2.4.- Determinación de los requerimientos para la germinación y viabilidad de semillas.

Los requerimientos para la germinación se estudiaron a partir de experimentos que simulaban condiciones a las cuales las semillas se encuentran expuestas en su ambiente natural. Dichas condiciones surgieron de datos tomados a campo, o en su defecto, de antecedentes para otras especies emparentadas. Para cada especie, se cosecharon semillas durante el período de maduración y dispersión, las que se acondicionaron para su almacenaje. Las semillas se colocaron en recipientes herméticos conteniendo bolsitas de silica gel, las que permitieron disminuir y uniformizar el contenido de humedad de las semillas a ca. 15 %. Posteriormente, fueron almacenadas en frascos de vidrio de color caramelo a 20 °C, sin luz. Cada frasco contenía una bolsita de 5 g de silica gel para monitorear posibles cambios en la humedad relativa de las semillas.

Las semillas limpias fueron incubadas en cámara en cajas de Petri (9 cm diámetro) con solución de agar al 1%, bajo tratamientos que simulaban las condiciones del ambiente natural, con control de luz y temperatura. Se aplicó un diseño factorial con dos niveles: temperatura alterna, 25-10 °C (25 °C: 8 h; 10 °C: 16 h) y constante 20 °C, fotoperíodo (luz: 8 h y oscuridad: 16 h) y sin fotoperíodo (oscuridad: 24 h) (N = 4; 25 semillas cada una). La viabilidad de las semillas no germinadas se comprobó mediante el Test de Tetrazolio (Copeland y Mc Donald 1985); los resultados se expresan en relación al número de semillas viables. En los tratamientos con luz, los recuentos de germinación se realizaron diariamente por un período aproximado de 15 días; en oscuridad se realizó un solo recuento al finalizar el ensayo. Se definió como semilla germinada aquella cuya radícula era > 1mm.

Una vez estandarizados los parámetros, se procedió a la germinación de las semillas correspondientes a la estación reproductiva (verano): 2002-2003, 2003-2004, 2004-2005 y 2005-2006.

Los porcentajes de germinación obtenidos en los tratamientos de luz y oscuridad fueron empleados para calcular el índice de Germinación Relativa a la Luz (GRL; Relative Light Germination, RLG; Milberg et al. 2000):

$$GRL = G_1 / (G_0 + G_1)$$

Donde G_1 es el porcentaje de germinación con luz, y G_0 el porcentaje de germinación en oscuridad. GRL representa un rango de valores entre 0 (germinación solo en oscuridad) y 1 (germinación sólo con luz).

El tiempo medio en germinar (TMG) expresado en días se calculó como:

$$TMG = \sum (D n) / \sum n$$

donde n es el número de semillas germinadas el día D , y D es el número de días desde el comienzo del ensayo.

3.2.5.- Datos climáticos: temperatura y precipitaciones (INA-CIRSA).

Los datos de precipitaciones totales y mensuales para el período de estudio fueron facilitados por el Instituto Nacional del Agua (INA), Centro de la Región Semiárida (CIRSA), Área Hidrología.

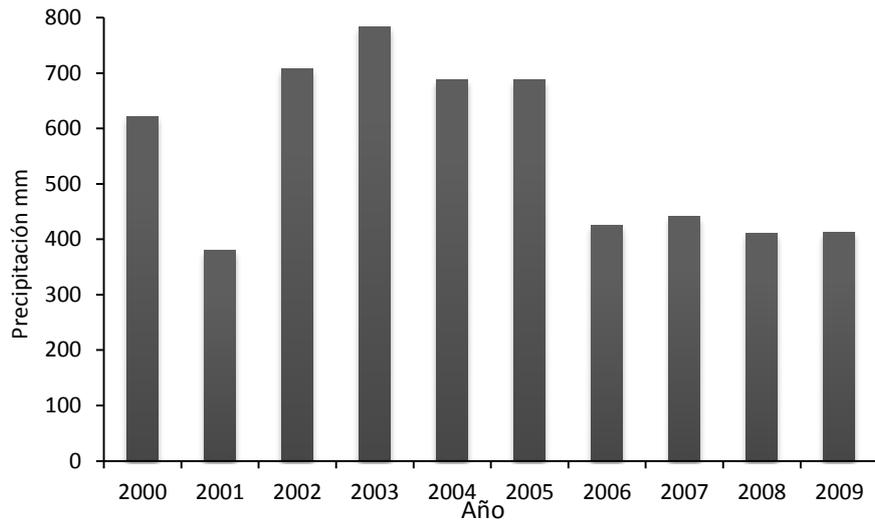


Figura 3.2 Precipitación acumulada anual para el período 2000 – 2009 “Estación Meteorológica Villa Giardino” Valle de Punilla, Córdoba. Datos otorgados por INA-CIRSA Instituto Nacional del Agua – Centro de la Región Semiárida, Sede Carlos Paz.

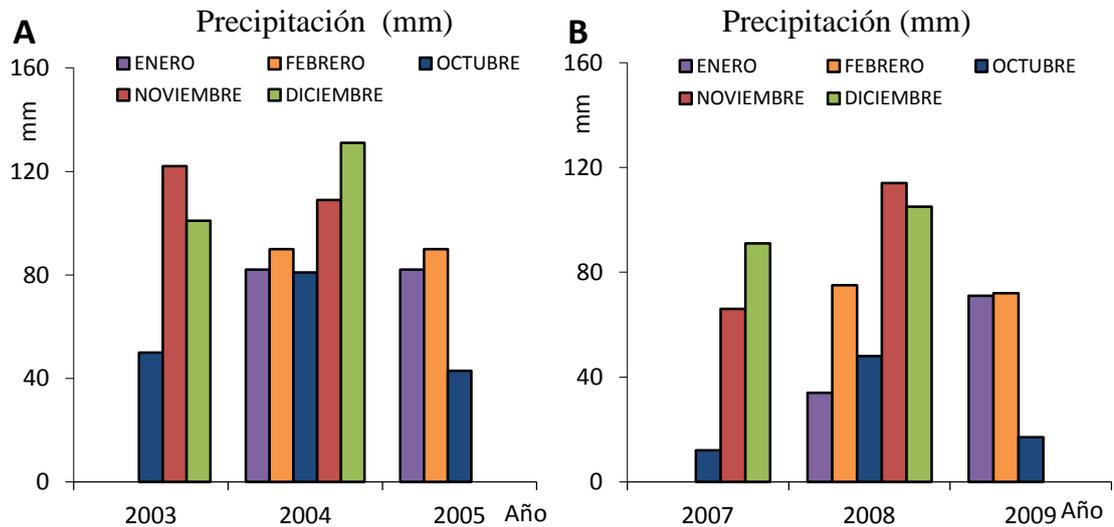


Figura 3.3 Precipitación acumulada mensual de los meses correspondientes a la floración y llenado de semillas para el período 2003-2005 (A) y 2007-2009 (B)

3.2.6.- Análisis estadístico de los datos

Las variables fueron comparadas estadísticamente utilizando el programa Infostat (2010 P). Se realizaron pruebas de ANOVA y el test de Tukey, con el objetivo de determinar si existen diferencias significativas entre las variables estudiadas en cada caso. Mediante regresión y correlación se analizaron las distintas relaciones de asignación de recursos dentro y entre los MV y MR, el crecimiento de cada fracción, y el esfuerzo reproductivo.

3.3.- RESULTADOS

3.3.1.- Crecimiento y asignación de recursos en los módulos vegetativos y reproductivos.

La biomasa total producida por los módulos vegetativos fue generalmente mayor que la producida por los módulos reproductivos para ambas especies y años estudiados (Figura 3.4 A y B), con excepción del año 2008 para *F. campestris* donde la biomasa de los MR fue mayor que la de los MV (1,8 vs. 1,2 g, respectivamente) (Figura 3.4 A). La variación entre años para el crecimiento de los MV y MR, calculado como la biomasa producida en el año de mayor producción respecto a la del año de menor producción (e.g., MV2009/MV2008 en *F. campestris*), muestra que ambas especies tienen capacidad de responder a las condiciones ambientales más favorables, con un aumento en la producción de biomasa. La respuesta de los MV en *F. campestris*, sin embargo, fue de ca. 3 órdenes de magnitud mayor respecto al de los MR de la misma especie, y a ambos módulos en *F. oolepis* (3,91 MV-FC vs. 1,77 MR-FC, 1,28 MV-FO, 1,45 MR-FO). Estos resultados indican que, al menos para los años estudiados, *F. campestris* tiene un comportamiento más plástico que *F. oolepis*, pudiendo el crecimiento de la parte vegetativa responder de manera significativa al ambiente. Por otro lado, en años más desfavorables, la producción de estructuras reproductivas estaría particularmente favorecida. En *F. oolepis*, en cambio, la biomasa producida por los módulos reproductivos en ambos años representa una fracción relativamente constante respecto de la biomasa producida por los módulos vegetativos (0,65 y 0,58 g para el 2004 y 2005, respectivamente).

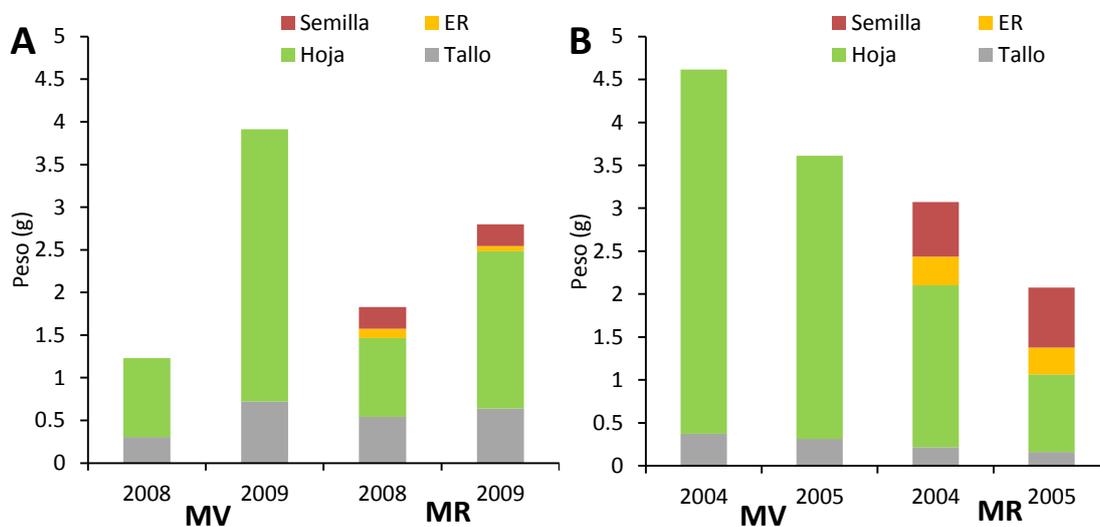


Figura 3.4 Distribución de la biomasa total producida durante la estación de crecimiento en los módulos vegetativos (MV) y los módulos reproductivos (MR), para cada uno de los años evaluados. **A:** *F. campestris*, **B:** *F. oolepis*. **ER:** estructuras reproductivas (receptáculo + pedúnculo).

Los MV de ambas especies invierten significativamente más biomasa en órganos fotosintetizantes (hojas) respecto a las estructuras de sostén (tallos) (Figura 3.4 A y B). Esto se vio reflejado en la estrecha relación existente entre la biomasa total producida por módulo en una estación de crecimiento y aquella asignada a hojas, cuyos coeficientes de determinación fueron (r^2) > 0,90 (Figuras 3.5 A-B y 3.6 A-B). En el caso de los tallos, la regresión lineal tuvo un ajuste entre el 0,62 y 0,75 para el caso de *F. campestris*, pero resultó pobre en *F. oolepis* (r^2 = 0,15 y 0,39 para el 2004 y 2005,

respectivamente) (cf. Figura 3.5 A-B y 3.6 A-B). Esto indicaría que la asignación de recursos a estructuras de sostén en esta especie se mantendría relativamente constante.

En *F. campestris*, la mayor biomasa asignada a hojas se tradujo en un aumento muy significativo en el número de hojas producidas por módulo. En el año 2009, los MV produjeron ca. 3,3 veces más hojas que en el 2008 (50 vs. 15, respectivamente). El peso promedio por hoja no sufrió cambios siendo de 0.06 g en ambos años, indicando un carácter muy constante para esta variable. Un patrón similar se obtuvo en *F. oolepis*, donde para el año 2004 se produjeron en promedio un 30 % más de hojas que en el año 2005 (26,5 vs. 20,5, respectivamente), sin modificarse el peso promedio de las hojas (0,16 g/hoja).

El peso seco de los tallos en *F. campestris* en el año 2009, fue ca. 2.4 veces mayor respecto al del año 2008 (0,72 vs. 0,31, respectivamente). Este incremento se tradujo en tallos más largos (62 %), de mayor diámetro (38%), y mayor peso específico (g/cm de longitud, 44 %), indicando que en años favorables el tallo es un destino donde se almacenan recursos que estarán disponibles para el crecimiento de las yemas en la siguiente estación de crecimiento. En *F. oolepis*, en cambio, no se registraron variaciones significativas en el peso destinado a tallos entre años (0,37 vs 0,30 para los años 2004 y 2005, respectivamente), ni en los valores promedio del diámetro (2,7 mm), longitud (8,3 cm) o peso específico (0,06 g/cm).

Como mencionamos precedentemente, el crecimiento de los MR de ambas especies fue menor que el de los MV, a excepción de *F. campestris* para el año 2008 (Figura 3.4 A y B). En los MR de ambas especies, sin embargo, aún cuando la proporción de la biomasa total del módulo asignada a hojas se mantuvo relativamente constante entre años (entre 40 y 58 %), el grado de ajuste de las regresiones lineales entre ambas variables no fue consistente (cf. Figuras 3.5 C-D y 3.6 C-D). En el caso de los tallos, *F. campestris* mostró un menor grado de ajuste respecto a los tallos de los MV, pero consistente entre años (r^2 ca. 0,4; Figura 3.5 C y D). En *F. oolepis*, en cambio, la relación entre la biomasa total y la de tallos fue variable entre años y con un ajuste mediano a muy pobre ($r^2 = 0,42$ vs. 0,16 para los años 2004 y 2005, respectivamente) (cf. Figura 3.6 C y D). Para ninguna de las especies ni años estudiados, se demostró que existiera relación entre la biomasa total de los MR y aquella asignada a las estructuras reproductivas ($r^2 < 0,04$, excepto en *F. oolepis* para el año 2005 $-r^2 < 0,32$) (Figuras 3.5 y 3.6, C y D).

La mayor biomasa asignada a hojas en los MR de *F. campestris* en el 2009, se tradujo en un aumento del 66 % en el número de hojas respecto al año 2008 (45 vs. 27, respectivamente), siendo el peso total de la fracción un 71 % mayor (1,85 vs. 1,08 g, años 2009 y 2008 respectivamente). Sin embargo, como en el caso de las hojas de los MV, el peso promedio de cada hoja se mantuvo constante entre años (0,04 g/hoja). En *F. oolepis*, el patrón de respuesta fue similar, aunque la diferencia fue aún mayor entre los años, siendo los valores para la biomasa total de hojas y el número total de hojas un 100 % mayor en el año 2004 respecto del 2005. Como en *F. campestris*, el peso promedio por hoja se mantuvo constante entre años (0,16 g/hoja) e igual al observado para las hojas de los MV.

En cuanto a los tallos de los MR, el peso seco de esta fracción en *F. campestris* fue sólo un 16 % mayor en el año 2009 respecto del 2008 (0,64 vs. 0,55 g, respectivamente), lo que se tradujo en un mayor crecimiento en largo de los tallos (20 %; 18,3 vs. 15,2 cm), sin que se modificara significativamente el diámetro ni el peso específico de los mismos (2,66 vs. 2,55 mm diámetro; 0,035 vs. 0,036 g/cm peso específico tallo, para los años 2009 y 2008 respectivamente). En *F. oolepis* se observó un patrón muy similar, aún cuando las diferencias en biomasa asignada a tallos entre años

fue considerablemente superior (i.e., 34%). Para esta especie también, la longitud fue la única variable afectada, produciéndose tallos más largos en el 2004 respecto al 2005 (10,7 vs. 7,8 cm, respectivamente), sin que se produjeran cambios en el diámetro o peso específico entre años (ca. 2 mm y 0,02 g/cm, respectivamente).

El número total de semillas producidas en los MR en *F. campestris* fue de 84 y 110 para los años 2008 y 2009, respectivamente, con un peso promedio por semilla de 2,34 mg para el 2008 y 3,15 mg para el 2009. En *F. oolepis*, el número total de semillas en el año 2004 fue un 85 % mayor respecto al año 2005 (161 vs. 87, respectivamente). Este aumento en el número de semillas se tradujo en una disminución en el peso individual de las semillas del orden de 60 % respecto al registrado en el año 2005 (3,95 vs. 6,38 mg, años 2004 y 2005 respectivamente).

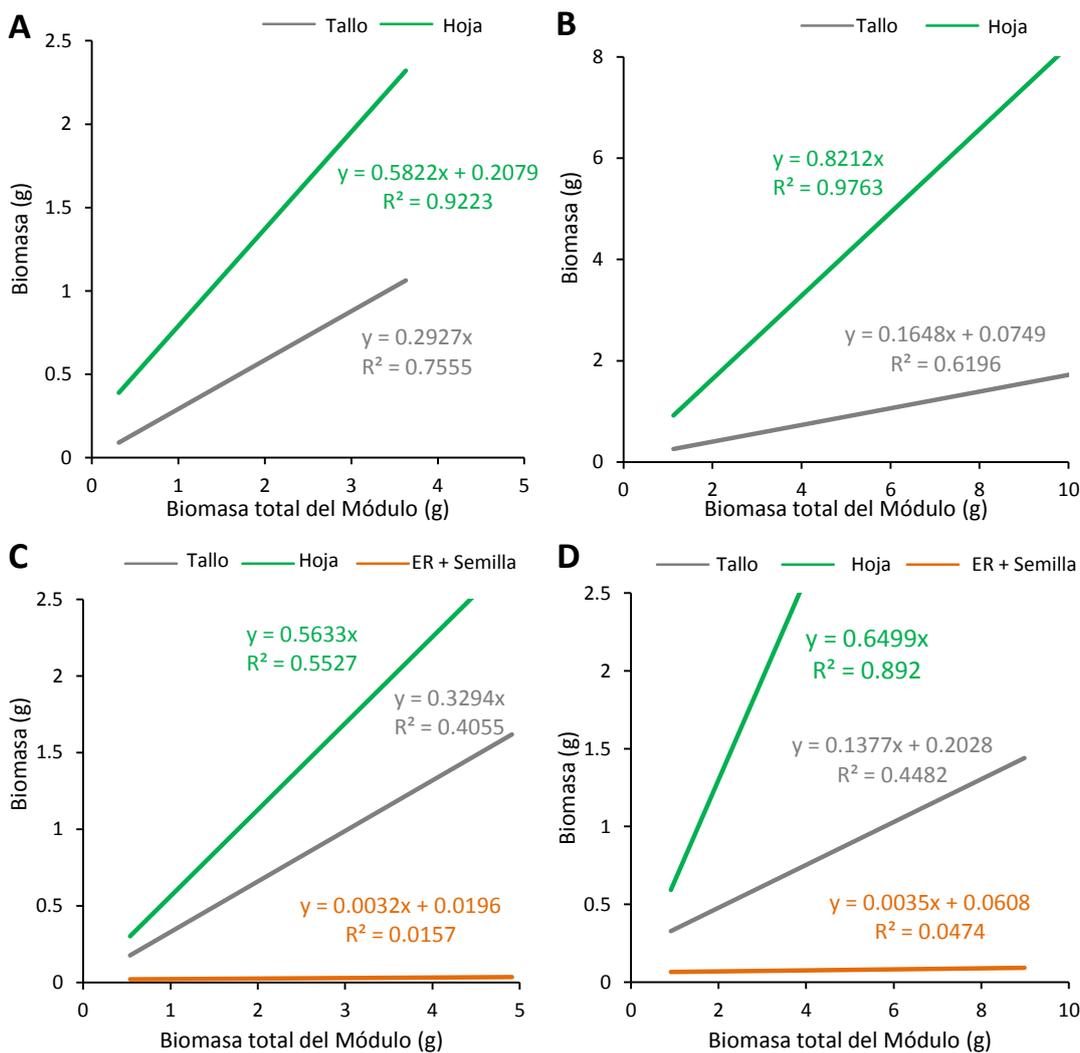


Figura 3.5 *F. campestris*. Relación entre la biomasa total producida por cada módulo durante la estación de crecimiento y la biomasa de las distintas fracciones que lo componen, para cada uno de los años estudiados. **A:** año 2008 MV, **B:** año 2009 MV. **C:** año 2008 MR, **D:** año 2009 MR. MV: Módulo vegetativo, MR: Módulo reproductivo, ER: estructuras reproductivas (receptáculo + pedúnculo).

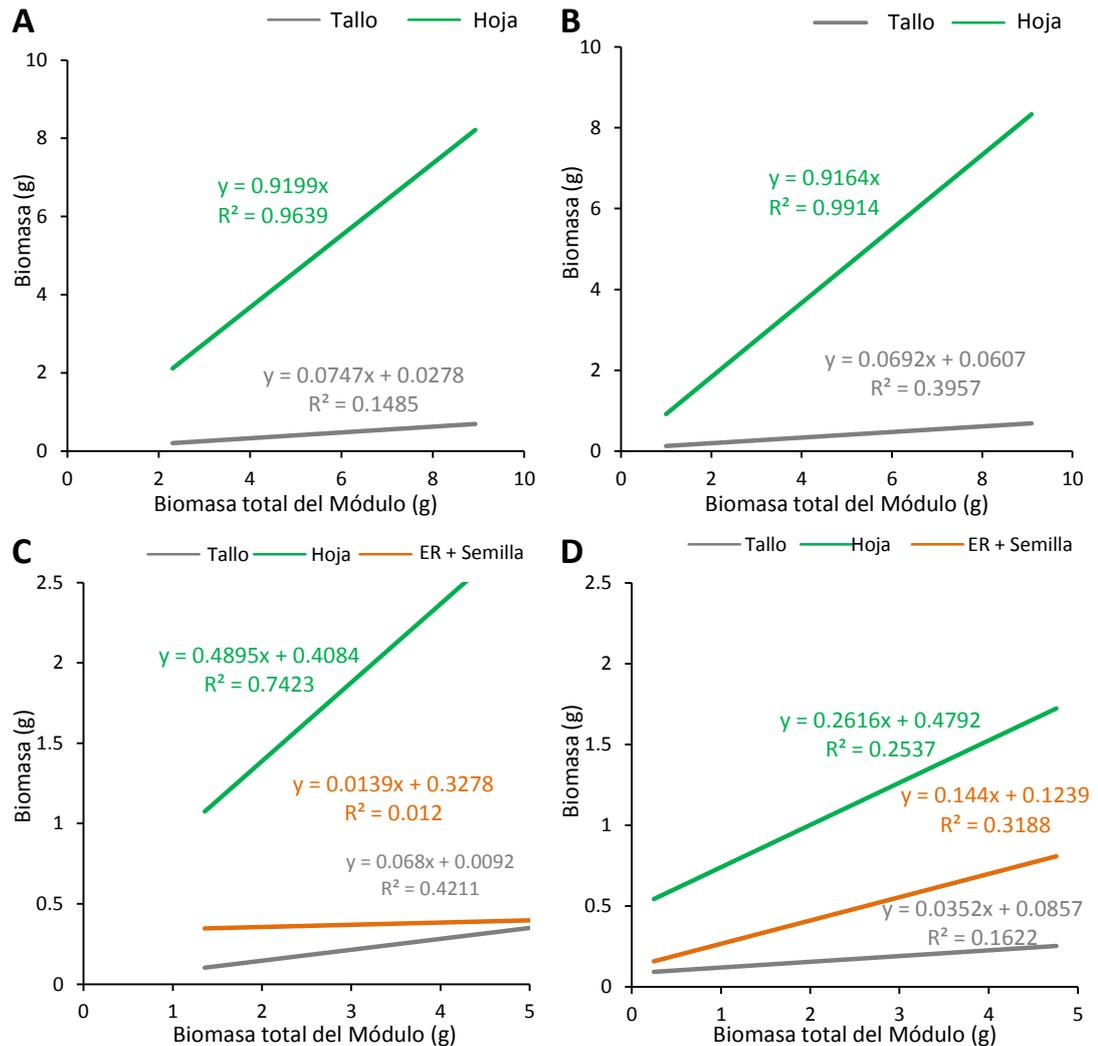


Figura 3.6 *F. oolepis*. Relación entre la biomasa total producida por cada módulo durante la estación de crecimiento y la biomasa de las distintas fracciones que lo componen, para cada uno de los años estudiados. **A:** año 2004 MV, **B:** año 2005 MV. **C:** año 2004 MR, **D:** año 2005 MR. MV: Módulo vegetativo, MR: Módulo reproductivo, ER: estructuras reproductivas (receptáculo + pedúnculo).

3.3.2.- Determinación de los requerimientos para la germinación de semillas (luz y temperatura).

En ambas especies, para el rango de temperaturas estudiadas, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos en relación al porcentaje total de semillas germinadas (Figura 3.7); sin embargo la temperatura tuvo un efecto significativo sobre la dinámica de la germinación. A temperaturas constantes la velocidad de germinación fue mayor respecto a lo observado bajo temperaturas alternadas (Figura 3.7 y Tabla 3.1 TMG). A los 2 d de incubación, entre un 20 y 30 % de las semillas se encontraban germinadas, mientras que a temperaturas alternadas la germinación fue nula; a los 5 d ca. el 75 % de las semillas germinaron a 20 °C, y sólo el 30 % germinaron a temperaturas alternadas. El fotoperíodo, en cambio, no produjo diferencias significativas en relación al porcentaje o dinámica de germinación. La germinación de las semillas de ambas especies fue muy similar tanto en luz como en oscuridad, tal como queda representado por los valores de GRL (Tabla 3.1).

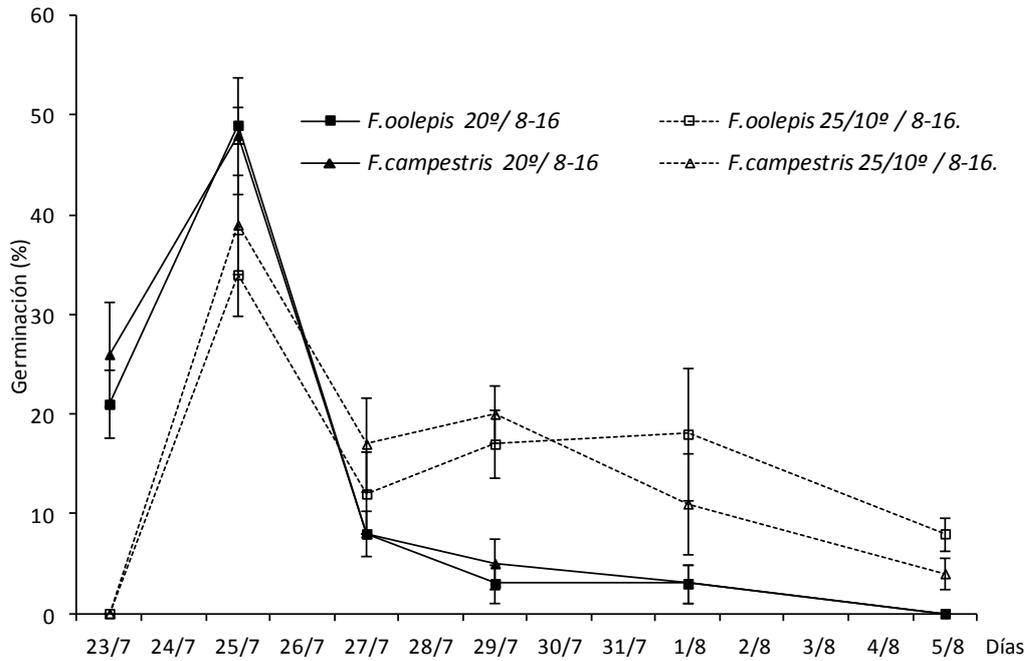


Figura 3.7 Determinación de los requerimientos de luz y temperatura para la germinación de semillas de *F. campestris* y *F. oolepis*. Dinámica de la germinación para semillas incubadas bajo dos regímenes de temperatura, constante (20 °C) y alternada (25 /10 °C).

Especie	20°C	20°C	25/10°C	25/10°C
	TMG	GRL	TMG	GRL
<i>F. campestris</i>	5,76 ± 0,15	0,53 ± 0,02	7,61 ± 0,36	0,51 ± 0,01
<i>F. oolepis</i>	5,84 ± 0,11	0,50 ± 0,01	7,83 ± 0,38	0,49 ± 0,004

Tabla 3. 1. Tiempo medio de germinación (TMG) y germinación relativa a la luz (GRL) bajo los dos regímenes de temperatura, para ambas especies. Los valores expresan la media ±1 ES.

En relación al año de producción de semillas, sólo aquellas producidas durante la estación 2004/2005 mostraron una germinación significativamente superior a los otros años (Figura 3.8, cf. años). Asimismo la viabilidad de las semillas para la estación 2004/2005 fue significativamente superior al registrado en los demás años (ca. 90 % vs. 50 a 70 %, $P < 0,05$, datos no presentados). Las precipitaciones durante la estación de crecimiento 2004/2005 fueron claramente superiores a la registradas para igual período de otros años (Figura 3.3) (período de octubre a febrero del año siguiente). Estos resultados serían concordantes con los presentados en el Punto anterior (3.3.1.-) donde se muestra que, para *F. campestris* al menos, la estación 2004/2005 fue una estación favorable, en la que las plantas produjeron mayor cantidad de biomasa, tanto en módulos vegetativos como reproductivos.

Los ensayos de viabilidad a lo largo del tiempo para semillas almacenadas en cámara (20°C, 15%HR) mostraron que ésta se mantiene elevada durante un año, decayendo luego en forma significativa. Estos resultados sugieren que para que se mantenga un banco de semillas viables, la producción de semillas debería ser continua a lo largo del ciclo de vida de la planta.

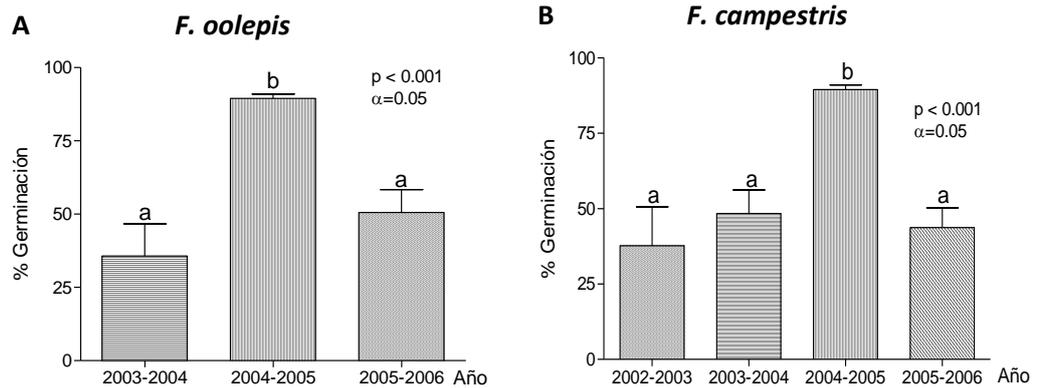


Figura 3.8. Germinación de semillas de *F. campestris* y *F. oolepis* incubadas con luz a 20 °C. **A:** Porcentaje de germinación de semillas de *Flourensia oolepis* correspondientes a los períodos 2003-2004, 2004-2005 y 2005-2006. **B:** Porcentaje de germinación de semillas de *F. campestris* para los períodos 2002-2003, 2003-2004, 2004-2005 y 2005-2006. Para ambas especies, el año de cosecha que registró diferencias significativas es el del grupo de semillas de 2004-2005, con porcentajes de germinación entre 80 y 90% y una elevada viabilidad (86%). Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,001$ $\alpha: 0,05$.

3.4.- DISCUSIÓN

Las plantas que poseen distintas formas de vida y que crecen en distintos ambientes pueden diferir en forma marcada en relación al patrón de asignación de recursos entre las distintas estructuras y funciones dentro de la planta (Chapin 1980, Mooney 1983); existe consenso en que estos patrones representan adaptaciones que aumentan el fitness de las planta (e.g., Gadgil y Solbrig 1972, Schulze et al. 1983, Obeso 2002). Siendo la fecundidad un componente mayoritario del fitness, y la producción de semillas un componente fundamental de la fecundidad, entonces se esperaría que las plantas maximizaran la asignación de recursos hacia la reproducción sexual y a la producción de semillas (Alpert et al. 1985). Cuando los recursos son limitantes, como en la mayoría de los sistemas, existe un compromiso entre la asignación de recursos que se deriva hacia el crecimiento vegetativo, la supervivencia (defensas) y la reproducción sexual (Obeso 2002). Desde los estudios compilados por Harper (1977) hasta la actualidad, las evidencias sustentan una correlación inversa entre el crecimiento vegetativo y la producción de frutos y semillas, lo que sugiere que ambos procesos no son completamente compatibles. La capacidad de las plantas de compatibilizar ambos procesos dependerá tanto de la plasticidad fenotípica en su patrón de crecimiento (destino de los meristemas y la arquitectura) como en los mecanismos específicos que les permitan compensar los costos de la reproducción (e.g.: crecimiento compensatorio e incremento de la actividad fotosintética, la contribución a la fotosíntesis de estructuras reproductiva, la reabsorción de nutrientes de estructuras senescente, etc.) (Tuomi et al. 1994, Obeso 2002).

Los patrones estructurales de las plantas están determinados por la combinación de tipos de módulos presentes, conformando así el sistema de vástagos (Barlow 1994). Como se ha descrito en el Capítulo 1, en el caso de *F. campestris* y *F. oolepis*, se generan reiteraciones con distinto origen y con distinto destino. Estas reiteraciones pueden dar origen sólo a crecimiento vegetativo, sólo a crecimiento reproductivo, o pueden ser mixtas. Asimismo dentro de cada reiteración se producirán una cantidad de módulos cuyo crecimiento y número dependerá estrechamente de la interacción entre la planta y el ambiente, y las relaciones fuente/destino dentro de la planta (Honkanen y Haukioja 1998, Preston 1999).

Para el caso de *F. campestris* y *F. oolepis*, la unidad de análisis fue la del módulo, y se estudió la asignación de recursos en módulos vegetativos (MV) y reproductivos

(MR) en dos años consecutivos, analizando la partición de biomasa entre los distintos órganos y estructuras que lo componen, y la respuesta de cada uno frente a las condiciones ambientales en cada año. Por ser las semillas una parte fundamental del fitness de las plantas, estudiamos además tanto los requerimientos para la germinación de las semillas de ambas especies, como la variabilidad interanual en relación a su capacidad de germinar y su viabilidad.

Los resultados en relación al crecimiento (biomasa) de los MV y MR mostraron que en términos generales los MV acumularon mayor cantidad de biomasa durante una estación de crecimiento, respecto a los MR (Figura 3.4). Esto se relaciona con la calidad de la biomasa producida, ya que en los MR la producción de otras estructuras, en particular las semillas, con mayor contenido proteico y lipídico, resulta biosintéticamente más costoso que la producción de hojas y tallos. La variación observada entre años para cada tipo de módulo permitió reconocer que estas especies pueden responder en forma plástica al ambiente, sobre todo aumentando su crecimiento cuando las precipitaciones son mayores durante el ciclo de crecimiento (cf. Figuras 3.2, 3.3 y 3.4). El hecho de que la respuesta de *F. campestris* entre años haya sido mayor que la de *F. oolepis* puede deberse a una mayor plasticidad propia de la especie, y/ o al hecho que los años estudiados en *F. oolepis* no presentaron condiciones ambientales muy contrastantes. En los años 2004 y 2005, la diferencia en precipitaciones fue de sólo 50 mm durante el período de crecimiento, respecto a los 270 mm de diferencia que se registraron entre los años 2008 y 2009 (Figuras 3.2 y 3.3). loAlpert et al. (1985) en estudios manipulativos con *Diplacus auranticus*, un arbusto del chaparral de la zona costera central de California (USA), también encontraron que el crecimiento de partes vegetativas y reproductivas estaba controlado por condiciones ambientales, en particular limitado por la disponibilidad de agua, más que la de nutrientes o luz. De todas maneras, en ambientes con baja disponibilidad de nutrientes, el N puede resultar limitante para el crecimiento de estructuras reproductivas que, debido a su baja transpiración, depende básicamente de los nutrientes que provienen de otras partes de la planta.

En *F. campestris* y *F. oolepis* encontramos que un aumento en la biomasa tanto en los MV como en los MR se traduce principalmente en un aumento de los órganos fotosintetizantes (Figura 3. 4 y Figuras 3.5 y 3.6). El número de hojas fue la variable más sensible, mientras que el tamaño de las hojas (g/hoja) se mantuvo muy constante en cada especie en los distintos años. El peso de los tallos en cambio, sufrió en general menos cambios que las hojas. El aumento en biomasa se tradujo en la generación de tallos más largos en los MR de ambas especies, sin que se produjeran cambios en el diámetro o peso específico de los mismos. En el caso de *F. campestris* para la estación 2009, ambientalmente más favorable, los tallos fueron no sólo más largos sino que el diámetro también aumentó. El aumento de estas dos variables indica que al menos parte de los fotoasimilados producidos durante la estación de crecimiento se destinan a aumentar la proporción de reservas en los tallos, las que podrán estar disponible para el crecimiento en el próximo año.

En los MR las regresiones entre la biomasa total producida durante el año y la biomasa invertida en estructuras reproductivas no mostraron una asociación positiva clara entre ambas variables para ninguna de las especies y años, siendo el mejor ajuste (ca. 0,35) el obtenido para *F. oolepis* en el año 2005 (Figuras 3.5 y 3.6 C y D). En términos generales, no obstante, hubo una tendencia a invertir mayor proporción en estructuras de sostén (receptáculos y capítulos) en años favorables. *F. oolepis* fue la especie que más respondió en términos del incremento en el número de semillas, siendo un 85 % mayor para el año 2004 respecto del 2005. Dado que la biomasa asignada a

estructuras reproductivas no aumentó en la misma proporción, el peso individual de las semillas en el 2004 se redujo en un 62 % respecto al año 2005. En *F. campestris*, en cambio, el aumento en biomasa estuvo acompañado por un incremento similar tanto del número (30 %) como del peso de las semillas (35 %). Esto muestra que la respuesta de ambas especies no fue la misma frente a cambios en las condiciones ambientales, y que *F. campestris* fue mucho más conservadora que *F. oolepis*, aún en años con diferencias muy grandes en disponibilidad de agua. Es probable que durante la combinación entre la ocurrencia puntual de lluvias y temperaturas y disponibilidad de polinizadores, hayan favorecido la producción de un número mayor de semillas, y que luego los recursos disponibles no hayan sido suficiente para el llenado de los frutos. En este sentido, y como ocurre en muchas especies, la demanda de fotoasimilados para el crecimiento y llenado de las semillas proviene en su mayor parte o exclusivamente del módulo en el que se originan (Obeso y Grubb 1993), e incluso una alta proporción puede depender de la hoja tectriz (30 %, Alpert et al. 1985) o de las mismas estructuras reproductivas (2,3 a 64%, Antlfinger y Wendel 1997, Ogawa y Takano 1997). Este parece ser el caso para estas especies, en el que en los MR las hojas senescen muy anticipadamente respecto a las de los MV. En *F. campestris*, los datos mostraron que el peso foliar específico, una de las variables involucradas en la eficiencia fotosintética, fue un 21 % mayor en las hojas de los MR respecto a la de los MV (3,55 vs. 2,92 mg/cm²). Asimismo el peso foliar específico medido en hojas senescentes de MR y MV recolectadas en planta, indicaron que la eficiencia de redistribución es mayor en las hojas de los MR respecto a los MV. La relación entre el peso foliar específico de la hoja verde y el de la hoja senescente mostró que en hojas de MV las hojas conservaban el 78 % de la biomasa (translocaron el 22%), mientras que este valor fue del 65 % en hojas del MR (translocaron 35 %). Estos resultados sugieren que las hojas de los MR presentarían características foliares y mecanismos que permitirían tanto un crecimiento compensatorio (mayor tasa fotosintética; Gifford y Evans 1981) como un mejor aprovechamiento de los nutrientes, azúcares y aminoácidos, a través de aumentar la eficiencia en la reabsorción a partir de las hojas senescentes (Nambiar y Fife 1987, Chapin y Moilanen 1991, Lambers et al. 1998).

En relación a los estudios sobre los requerimientos para la germinación, ambas especies mostraron que la temperatura, y no la luz, era el factor determinante en disparar la germinación, regulando la dinámica de la germinación. A temperaturas constantes, la germinación se aceleró respecto de las incubadas a temperaturas alternadas. Este tipo de respuesta resultaría adaptativa para estas especies ya que la temperatura señalaría a la semilla respecto de su posición relativa en el perfil del suelo. Así, las temperaturas constantes indicarían a la semilla que estaría enterrada a una profundidad mayor, respecto a la que censaría la semilla frente a temperaturas alternadas, que indicarían un nivel mucho más superficial (Baskin y Baskin 1998). Una localización superficial puede resultar inconveniente al menos por dos razones: 1) la posibilidad de que las semillas sean arrastradas por las lluvias que en estos ambientes son en muchos casos torrenciales, y 2) que después de una lluvia más somera el horizonte superficial se seque rápidamente, ocasionando la muerte de la semilla germinada. Este posible mecanismo de percepción de la profundidad permitiría reducir las chances de que la germinación ocurriera fuera de la ventana de tiempo que maximice la emergencia y supervivencia de la plántula.

En ambas especies, las diferencias climáticas entre años apoyan la hipótesis que los factores ambientales estarían regulando tanto la viabilidad como el grado de dormición de las semillas. Los niveles de germinación y viabilidad más bajos observados en los restantes períodos coinciden con escasa o nula precipitación, y temperaturas elevadas

durante la formación y llenado de las semillas. Asimismo, es importante mencionar que dentro de las semillas no viables, entre el 10-25% de las semillas recolectadas de poblaciones naturales presentaron insectos, adultos o pupas, de por lo menos 2 especies de avispas que aún no han sido identificadas (datos no presentados). Resultados sobre el mantenimiento de la viabilidad en condiciones controladas sugieren que las semillas no deben formar bancos persistentes, por lo que el mantenimiento de las semillas en el banco debería reponerse anualmente a expensas de la reproducción sexual. De todas maneras, a partir de las observaciones realizadas a campo durante todos estos años podemos concluir que los eventos de germinación y emergencia no son frecuentes en las condiciones naturales típicas. En general, el mayor reclutamiento de plántulas se observa en sitios que han sufrido algún tipo de disturbio, particularmente remoción de suelo, ya sea por causas antrópicas (e.g., bordos de caminos, mantenimiento de accesos) o por acción de la fauna local. Sin embargo, la posibilidad de respuesta frente a disturbios es importante en el aumento del número de individuos en poblaciones ya instaladas y en la colonización de nuevas áreas.

Capítulo 4

Efectos fitotóxicos de extractos acuosos y aceites esenciales de *Flourensia campestris* y *Flourensia oolepis*.

Parte de estos resultados han sido publicados en Silva et al. 2012.

4.1.- INTRODUCCIÓN

Las interacciones entre plantas pueden tener un rango de acción variado, siendo en algunos casos positivo (facilitación), neutro o negativo (competición) dependiendo de las especies involucradas (Bazzaz 1996, Li et al. 1999). En algunas plantas, uno de los factores más importantes que restringe su desarrollo es la presencia de una planta vecina, generalmente compitiendo por un recurso escaso que limita su crecimiento (competición por recurso). Sin embargo, también podemos hablar de competencia cuando una planta afecta de modo nocivo (negativamente) el crecimiento y el desarrollo de sus vecinas, denominándose “alelopatía” (del griego *allelon* = uno al otro, *pathos* = sufrir; efecto injurioso de uno sobre otro) (Molisch 1937). Este tipo de interacción se produce por la liberación al medio de compuestos químicos (metabolitos secundarios) los cuales son producidos por los distintos órganos de la planta o son derivados de la descomposición del material vegetal. Si la bioactividad del compuesto ha sido comprobada a campo hablamos de compuestos alelopáticos, pero si su acción solo se ha demostrado en laboratorio se denominan aleloquímicos. Estos compuestos han recibido especial atención por sus implicancias ecológicas y su potencial agroindustrial como herbicidas e insecticidas naturales selectivos (Benner 1996, Duke et al. 2000).

La alelopatía juega un rol importante en muchos ecosistemas y apenas estamos comenzando a entender cómo las señales químicas intervienen en la comunicación de las plantas con sus vecinas. Estas nuevas áreas tienen un gran potencial de aplicación en la agricultura, la silvicultura y la ciencia del medio ambiente. Sin embargo, en los bosques nativos de la provincia de Córdoba, son escasos los estudios en relación a comprender cómo estos mecanismos podrían estar involucrados en la persistencia de especies nativas.

Formando parte de los objetivos del grupo de investigación relacionados al estudio de la ecofisiología de las especies nativas, se decidió investigar la presencia de efectos fitotóxicos en *Flourensia oolepis* (FO) y *F. campestris* (FC) que tuvieran relación con su adaptación, competencia y perpetuidad en su hábitat natural. Estudios previos sobre el género *Flourensia* han comprobado la existencia de una gran variedad de metabolitos secundarios presentes en los distintos órganos de la planta, con un amplio espectro de actividades biológicas.

En *F. oolepis* se han caracterizado los aceites esenciales (Priotti y Zygadlo 1997) y su acción insecticida (García et al. 2007, Díaz Napal et al. 2009). En la parte aérea se han detectado sesquiterpenos, flavonoides (Guerreiro et al. 1979) y monoterpenoides (Estell et al. 1998, Grayson 2000, Kobaisy et al. 2001, Tellez et al. 2001), mientras que en *F. campestris* se ha demostrado la presencia de derivados del benzofurano y flavonoides (Dillon y Mabry 1977, Mc Cormick et al. 1986, Fukai y Nomura 1990, Uriburu et al. 2004). Sin embargo, no se ha abordado hasta el presente el estudio de aleloquímicos con acción fitotóxica que pudieran estar involucrados en la ecofisiología de estas especies.

Los metabolitos pueden ser liberados al ambiente por una variedad de mecanismos: volatilización de las hojas, exudación de raíces y tallos, y lixiviación de hojas por las precipitaciones (Vyvyan 2002). Los compuestos volátiles y otros compuestos apolares presentes en los aceites esenciales han sido involucrados en la alelopatía de diferentes especies vegetales (Harborne 1997, Kohli et al. 1998, Isman 1999, Vokou 1999, 2000, Romagni et al. 2000). Los compuestos que han mostrado tener participación en procesos alelopáticos por lixiviación o exudado se han obtenido normalmente a partir de extractos acuosos de los distintos órganos de las plantas, en condiciones controladas (para una revisión ver Dayan y Duke 2006). Las condiciones suaves de una extracción acuosa a temperatura ambiente sugieren que los efectos observados mediante su

bioensayo en laboratorio podrían tener lugar a campo, cuando las hojas (frescas en planta o secas en suelo) son lixiviadas por el agua de lluvia. La etapa siguiente comprende una aislación cromatográfica bio-dirigida de los compuestos activos a partir de los aceites esenciales o extractos acuosos y una posterior caracterización e identificación molecular por técnicas espectrales.

En este contexto, y como primera etapa, se evaluó la bioactividad de extractos acuosos y de aceites esenciales de *F. oolepis* y *F. campestris* sobre otra especie vegetal, determinando los efectos fitotóxicos sobre la germinación y el crecimiento de *Lactuca sativa*, una especie muy sensible y ampliamente utilizada en bioensayos.

A modo de hipótesis, se esperó determinar que los extractos acuosos y los aceites esenciales de *F. oolepis* y *F. campestris* presentaran efectos fitotóxicos sobre la germinación y/o el desarrollo de *L. sativa*, conformando así un potencial mecanismo de competencia que facilitaría la persistencia de estas especies en ambientes naturales. Cabe destacar que la hipótesis cuenta con la especificación de la especie utilizada en los bioensayos (*L. sativa*) ya que numerosos aleloquímicos poseen actividad biológica específica de especie, por lo que una falta de actividad biológica sobre lechuga no implicará necesariamente la ausencia total de efectos fitotóxicos.

El estudio de los efectos sobre las interacciones planta-planta en otras especies, la caracterización e identificación de los metabolitos secundarios y la regulación de su producción como respuesta a condiciones ambientales, permitirán entender el rol que los principios activos juegan en el mantenimiento de estas poblaciones naturales.

Cuestiones a abordar:

¿Existen efectos fitotóxicos en extractos acuosos y aceites esenciales de *F. oolepis* y *F. campestris*? ¿Qué tipo de compuestos son los responsables de los efectos en los extractos acuosos?

Para responder estos interrogantes se realizaron:

- a) Bioensayos en cápsulas de Petri a fin de determinar los efectos fitotóxicos de los extractos acuosos de los distintos órganos y de los aceites esenciales de hojas de *F. oolepis* y *F. campestris* sobre la germinación y el crecimiento de *Lactuca sativa*,
- b) Particiones con solventes de los extractos acuosos y bioensayos para determinar los componentes responsables de los efectos encontrados.

4.2.- MATERIALES Y MÉTODOS.

4.2.1.- Material vegetal

4.2.1.1 Área de Muestreo

F. campestris y *F. oolepis* fueron recolectadas en áreas naturales del Valle de Punilla, provincia de Córdoba, Argentina (Capítulo 2 -Figuras 1.3 y 1.4-). Especímenes de *F. campestris* (BAA 26.498) y *F. oolepis* (BAA N°26.499) fueron depositados en el Herbario Gaspar Suarez de la Facultad de Agronomía, UBA.

4.2.1.2 Muestreo

En cada sitio y para cada especie, se cosechó material de 10 individuos. De cada individuo se recolectaron hojas, capítulos con flores abiertas y raíces. Las cosechas se realizaron en verano.

4.2.1.3.- Secado y almacenamiento.

El material vegetal fue secado a temperatura ambiente protegido de la luz solar o en estufa a 30 °C. Se almacenó (previa separación de órganos enteros) en bolsas de papel, en ambiente oscuro y seco hasta su procesamiento.

4.2.2.- Bioactividad de extractos acuosos.

Con el fin de simular las condiciones presentes en el ambiente natural, la obtención de los extractos acuosos se realizó con material seco, “entero” y a temperatura ambiente controlada.

4.2.2.1.- Extractos acuosos

En base a lo mencionado anteriormente y a referencias bibliográficas (Reigosa 1996, Wu et al. 2001), se trabajó con extractos acuosos al 6 %, colocando 6 g de material vegetal entero seco en 100 ml de agua destilada, en cámara oscura a una temperatura de 22 °C, durante 24 h. Transcurrido este período de tiempo el material vegetal fue separado de la fracción líquida por filtración, obteniéndose así el extracto acuoso (EAq) que fue utilizado inmediatamente en los bioensayos.

4.2.2.2.- Bioensayos

En cápsulas de Petri de 10 cm de diámetro (5 por tratamiento) previamente rotuladas, se colocó un disco de papel de filtro. Las cápsulas fueron regadas con 3 ml de EAq al 6% y con diluciones del mismo con agua destilada al 3, 1,5 y 0,75 %. En los controles se utilizaron cápsulas acondicionadas de mismo modo pero regadas con 3 ml de agua destilada. Posteriormente se sembraron 50 semillas de lechuga (*Lactuca sativa*, Grand Rapids) por cápsula y se incubaron a 22° C en oscuridad. Se contabilizó el número de semillas germinadas (tomando como criterio que la radícula tenga por lo menos 1 mm de longitud -Bewley y Black 1985-) a las 24, 48 y 72 h. Se calculó el porcentaje de inhibición de la germinación y la velocidad de germinación o vigor (Singh et al. 2003). Transcurridas las 72 h, se seleccionaron 15 plántulas al azar por cápsula, en las que se midió la longitud del vástago y raíz.

4.2.2.3 Partición de los EAq:

En aquellos casos en que se manifestaron efectos fitotóxicos, se realizaron particiones de los EAq con Acetato de Etilo (EtOAc) al 20 % de concentración final. La fase acuosa fue separada por centrifugación y se obtuvo la fase orgánica (EAc) conteniendo la fracción de metabolitos secundarios, que fue utilizada para los bioensayos. Las cápsulas de Petri fueron regadas con una cantidad equivalente de EAc semejante a los EAq midiendo la absorbancia de ambos a 254 nm. Una vez evaporado el solvente en estufa a 30 °C, las cápsulas fueron regadas con 3 ml de agua destilada. Los controles fueron procesados de la misma manera utilizando EtOAc puro. Una fracción de los EAc fue secada a 30 °C con corriente de N₂ y pesada a fin de conocer la concentración (en mg ml⁻¹) utilizada en los bioensayos.

4.2.2.4.- Cálculo y expresión de los resultados:

4.2.2.4.1.- Porcentaje de inhibición de la germinación (Ig)

$$I_g = \frac{(N_t - N_i)}{N_t} \times 100$$

N_t: promedio del número de semillas germinadas en los controles.

N_i : promedio del número de semillas germinadas en cada tratamiento.

4.2.2.4.2.- Velocidad de germinación (emergencia) o vigor germinativo

\sum (promedio del número de semillas germinadas diariamente / número de días)

4.2.2.4.3.- Porcentaje de inhibición del crecimiento de raíz o vástago (I_r , I_t)

$$I_r \text{ o } I_t = \frac{(X_t - X_i)}{X_t} \times 100$$

X_t : medida promedio de la longitud de la raíz o vástago en los controles.

X_i : medida promedio de la longitud de la raíz o vástago en cada tratamiento

4.2.2.4.4.- Concentración inhibitoria 50 (CI_{50})

La concentración de los extractos que inhibieron el 50 % de la germinación y crecimiento (CI_{50}) se halló por extrapolación de las curvas dosis-respuesta. Luego se determinaron los coeficientes de correlación que indiquen una relación dosis-respuesta entre las concentraciones y la germinación, y entre las concentraciones y el crecimiento. Una vez ajustada la función se calculó la CI_{50} .

4.2.2.5.- Caracterización fisicoquímica de los extractos acuosos.

A fin de caracterizar los Eaq y descartar posibles efectos inespecíficos en el bioensayo, se midieron las siguientes variables:

4.2.2.5.1.- pH, concentración de sales y sólidos totales disueltos

Estas tres variables se determinaron utilizando un Checker Hanna (H198129) con corrección automática de temperatura. Los resultados se expresaron en unidades de pH, en $\mu\text{S cm}^{-1}$ (conductividad) y en ppm (sólidos totales disueltos, STD).

4.2.3.- Bioactividad de los aceites esenciales

4.2.3.1.- Extracción de los aceites esenciales

La obtención de los aceites esenciales (AcEs) se llevó a cabo mediante hidrodestilación por arrastre con vapor de agua en un sistema Clevenger (Figmay), con cámara de extracción separada de 3 l de capacidad, durante 3 h. Se utilizaron 30 g de hojas secas enteras de cada especie. Los aceites obtenidos se conservaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su utilización.

4.2.3.2.- Bioensayos

Los AcEs fueron diluidos a concentraciones finales de 500, 1000 y 1500 ppm con EtOAc. Las cápsulas de Petri fueron regadas con 3 ml de las diluciones y el solvente fue evaporado a $30\text{ }^\circ\text{C}$ en estufa. Posteriormente se regó cada cápsula con 3 ml de agua destilada conteniendo Tween 20 al 0,1 % y se siguieron los pasos descriptos en el punto 4.2.2.2. Las cápsulas controles fueron regadas con 3 ml EtOAc puro, evaporado a $30\text{ }^\circ\text{C}$ y regadas con 3 ml de agua destilada conteniendo la misma concentración de Tween 20.

4.2.4.- Análisis estadístico de los datos

Para evaluar los efectos sobre la germinación y crecimiento se empleó análisis de varianza (ANOVA) y el test de Tukey (Infostat/Profesional versión 2010p).

4.3.- RESULTADOS

4.3.1.- Bioactividad de EAq de *F. campestris*

La bioactividad de los distintos extractos acuosos de *F. campestris* sobre la germinación y el crecimiento de *L. sativa* se muestra en la Tabla 4.1.

Los extractos acuosos de hojas secas de *F. campestris* presentaron potentes efectos inhibitorios sobre la germinación (CI_g50 = 3,9 %) y el crecimiento de tallo (CI_t50 = 2,0 %) y raíz (CI_r50 = 1,5 %) de *L. sativa*, siguiendo el patrón de una curva típica de dosis-respuesta (Figura 4.1 A). En concentraciones de 1,5 y 0,75 % se mantuvo solo el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de tallo (entre 40 y 20 % vs. control) y de raíz (entre 50 y 30 % vs. control).

La velocidad de germinación presentó un retraso en la emergencia de la radícula de *L. sativa* en las primeras 24 h para todas las concentraciones del EAq de hoja. Sin embargo, en los EAq al 1,5 y 0,75 %, el efecto disminuyó a las 48 h, llegando al mismo número de semillas germinadas que los controles a las 72 h, mientras que los extractos más concentrados (3 y 6 %) mantuvieron el efecto inhibitorio durante el total del período estudiado (Figura 4.2 A).

Las raíces de semillas germinadas en presencia de los EAq presentaron notables variaciones de su morfología externa comparada con los controles. Se observaron raíces delgadas y rectas con escasos o nulos pelos absorbentes, características que se fueron acentuando a medida que se incrementó la concentración de los EAq. Sólo en concentraciones \geq al 3 % se hicieron visibles ápices radicales necrosados y amarillos.

En los EAq de inflorescencias se encontró un efecto inhibitorio similar al observado en los EAq de hoja, pero sólo sobre el crecimiento de tallo y de raíz de *L. sativa*. En este caso todas las concentraciones disminuyeron el crecimiento del tallo y de raíz entre 30 y 70 % con respecto al control. Si bien se mantuvo el efecto negativo observado en hoja, en esta fracción fue más leve (Figura 4.1 B). El número total de semillas germinadas no presentó diferencias significativas con respecto a los controles, para ninguna de las concentraciones. Sin embargo, en las cápsulas tratadas con los extractos al 1,5 y 3 %, hubo un retraso en la emergencia de la radícula de lechuga en las primeras 24 h. En los EAq al 1,5 % el efecto disminuyó a las 48 h, alcanzando igual número de semillas germinadas que los controles, mientras que el extracto al 3 % mantuvo un leve efecto transcurridas las 72 h (Figura 4.2 B).

Los EAq de raíz y de semilla mostraron efectos fitotóxicos sólo sobre el crecimiento de la raíz de *L. sativa* (entre 20 a 30 % vs. control, Figura 4.1. C y D).

		<i>Flourensia campestris</i>																			
		6 %				3 %				1,50 %				0,75 %				0,35 %			
		G	VE	LT	LR	G	VE	LT	LR	G	VE	LT	LR	G	VE	LT	LR	G	VE	LT	LR
Hoja	EAq	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	-	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓	-	-	-	-
	EAc	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓	↓	↓	↓	-	-	↓	↓	-	-	↑	↑
Flor	EAq	-	-	-	-	-	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓	-	-	↓	↓	-	-	-	-
	EAc	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	↓	-	-	-	↓	-	-	-	-
Semilla	EAq	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EAc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raíz	EAq	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	↓	-	-	-	-
	EAc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 4.1. Bioactividad de los distintos extractos acuosos de *F. campestris* sobre la germinación y el crecimiento de *Lactuca sativa*. EAq, extracto acuoso; EAc, fase apolar de la partición de EAq con EtOAc; G, germinación; VE, velocidad de emergencia o vigor germinativo; LT, longitud de tallo; LR, longitud de raíz; (-), sin efecto; (↓↓), marcada disminución; (↓), disminución; (↑), aumento.

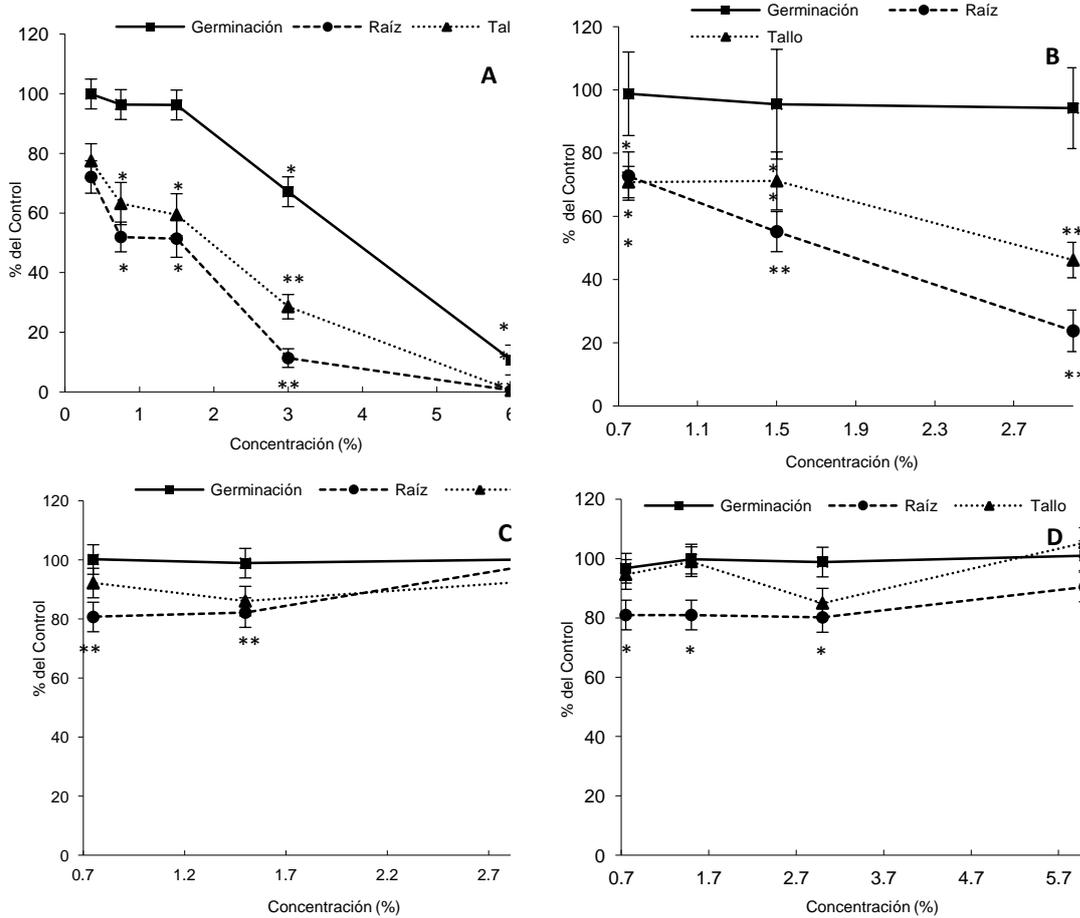
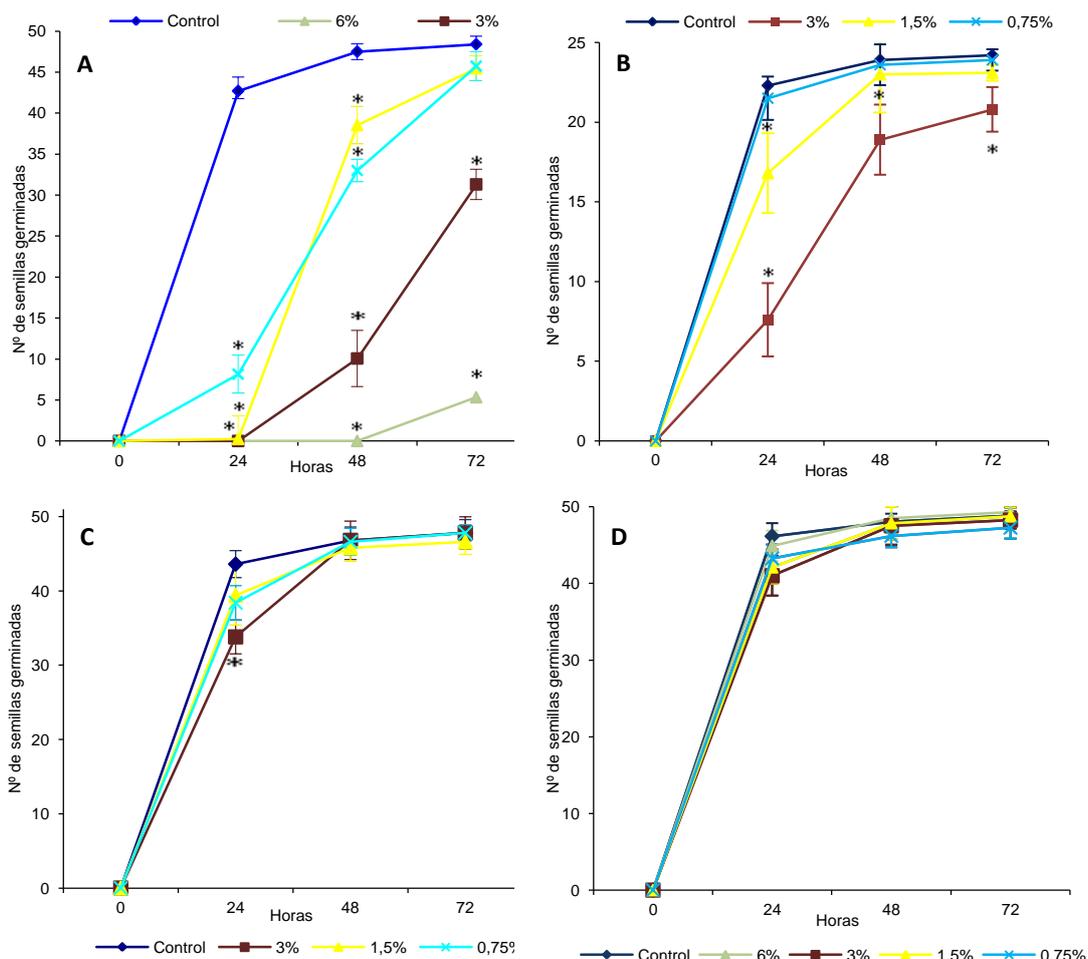


Figura 4.1. Bioactividad de extractos acuosos de hoja (A), flor (B), raíz (C) y semilla (D) de *F. campestris* sobre la germinación y el crecimiento de raíz y tallo de *L. sativa* a las 72 h. Los puntos representan medias entre bioensayos independientes (n=3). (*), (**); diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente).



4.3.2.- Bioactividad de la fase apolar (EAc) de la partición de EAq de *F. campestris* con EtOAc

La fracción apolar (EAc) obtenida mediante la partición con EtOAc de los EAq de hoja de *F. campestris* presentó un potente efecto inhibitorio sobre la germinación ($CI_{50} = 1,7 \text{ mg ml}^{-1}$) y el crecimiento de tallo ($CI_{50} = 1,0 \text{ mg ml}^{-1}$) y raíz ($CI_{50} = 0,8 \text{ mg ml}^{-1}$) de *L. sativa* (Figura 4.3). Aunque la tendencia en la respuesta de cada parámetro fue similar (Tabla 4.1), la actividad fitotóxica específica de los EAq fue 3 veces superior a la de los EAc.

De todos los parámetros medidos, el crecimiento de raíz de *L. sativa* fue el más afectado, registrándose una disminución de la elongación de las mismas de 70 hasta 90 % dependiendo de la concentración de los EAc (Figura 4.3). Las raíces obtenidas bajo las distintas concentraciones fueron delgadas y rectas, con escasos o nulos pelos absorbentes (las mismas anomalías morfológicas observadas en los EAq) y con mayor evidencia de tejido dañado en los ápices radicales (puntas negras/necrosadas).

Todas las concentraciones de EAc retrasaron la emergencia de la radícula de *L. sativa* en las primeras 48 h. En los EAc al $0,45 \text{ mg ml}^{-1}$ el efecto disminuyó a las 48 h, alcanzando valores de germinación de 80 % vs control. Las restantes concentraciones ($1,8, 1,35$ y $0,9 \text{ mg ml}^{-1}$) mantuvieron los efectos inhibitorios transcurridas las 72 h (Figura 4.4).

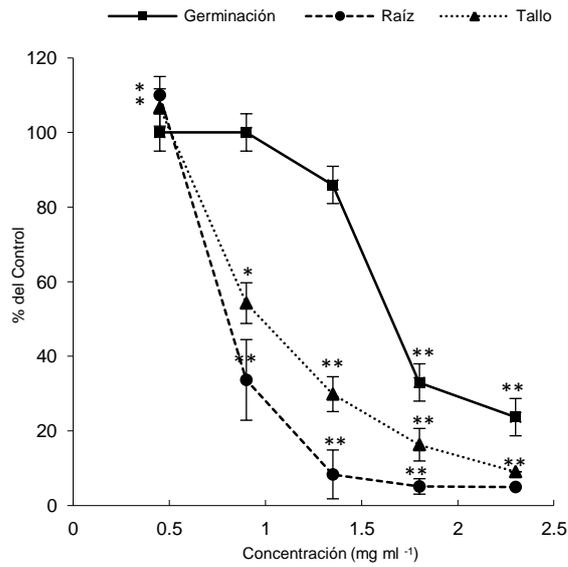


Figura 4.3. Bioactividad de las distintas concentraciones de los EAc de hojas de *F. campestris* sobre la germinación y el crecimiento de raíz y tallo de *L. sativa* a las 72 h. Los puntos representan las medias de 3 bioensayos independientes. (*) y (**) indican diferencias significativas con el control ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente).

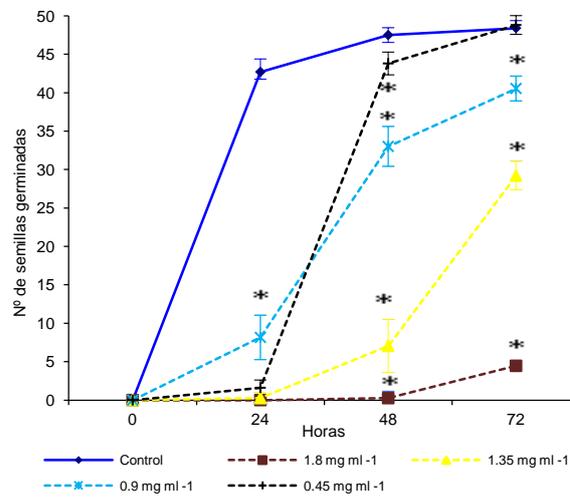


Figura 4.4. Efecto de las distintas concentraciones de los EAc de hoja de *F. campestris* sobre la germinación de *L. sativa*. Germinación acumulada por 72 h de tratamiento. (*) indica diferencias significativas con el control ($p < 0,01$).

4.3.3.- Bioactividad de EAq de *F. oolepis*

La bioactividad de los extractos acuosos de *F. oolepis* sobre la germinación y el crecimiento de *L. sativa* se muestran en la Tabla 4.2.

Los EAq de hojas secas de *F. oolepis* presentaron diferentes patrones de acción sobre el crecimiento de raíz y de tallo de *L. sativa*. Los extractos al 3 y 6 % afectaron de modo negativo la longitud de raíz y de tallo (20 % vs control, $p < 0,01$), en cambio las concentraciones menores (1,5 y 0,75 %), resultaron en una estimulación de la elongación de 10 % en raíz y 40 % en tallo (Figura 4.5 a). Sin embargo, todas las concentraciones del EAq retrasaron la emergencia de la radícula de *L. sativa* las primeras 24 h (30 a 40 %). A partir de las 48 h el efecto disminuyó, y a las 72 h ya no se observaron diferencias significativas entre el número de semillas germinadas en los tratamientos y el control (Figura 4.6 A).

En los EAq de inflorescencias si bien se mantuvo el efecto inhibitorio al 3 % (80 % vs. control, $p < 0,01$) sobre el crecimiento de tallo y raíz, éste fue mayor que el observado para la misma concentración en la fracción hoja. Con respecto a la velocidad de germinación, solo en las primeras 24 h se observó un retraso en la emergencia de la radícula en las cápsulas tratadas con los extractos más concentrados (3 %). Transcurrido este período, no se hallaron diferencias significativas entre las distintas concentraciones (3, 1,5 y 0,75 %) y los controles (Figura 4.6 B)

En el EAq de raíz solo las mayores concentraciones resultaron promotoras de la elongación de tallo y de raíz. El mayor efecto se observó al 3% provocando un incremento en la elongación de tallo del 33 % y de raíz del 43 %; en las concentraciones restantes no hubo diferencias significativas. Del mismo modo, los EAq al 3 % presentaron un efecto inhibitorio de la velocidad de emergencia a las 24 h del tratamiento, al igual que lo observado en los extractos de flor. Las restantes diluciones de los extractos de raíz, retrasaron un 25 % la velocidad de emergencia las primeras horas de tratamiento (Figura 4.6 C).

Los EAq de hoja, flor y raíz no presentaron efectos sobre la germinación de *L. sativa*.

Los EAq de semillas, en todas sus concentraciones, no presentaron actividad fitotóxica significativa sobre la germinación y el crecimiento de *L. sativa*.

		<i>Flourensia oolepis</i>																			
		6 %				3 %				1,50 %				0,75 %				0,35 %			
		G	VE	LT	LR	G	VE	LT	LR	G	VE	LT	LR	G	VE	LT	LR	G	VE	LT	LR
Hoja	EAq	-	↓↓	↓↓	↓↓	-	↓	↓	↓	-	↓	-	↑	-	-	↑	↑	-	-	-	-
	EAc	-	↓↓	↓↓	↓↓	-	↓	↓	↓	-	↓	↓	-	-	↓	↓	↑	-	-	-	-
Flor	EAq	-	-	-	-	-	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓	-	-	↓	↓	-	-	-	-
Semilla	EAq	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raíz	EAq	-	-	-	-	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 4.2. Bioactividad de los extractos acuosos de *F. oolepis* sobre la germinación y el crecimiento de *L. sativa*. EAq, extracto acuoso; EAc, fase apolar de la partición de EAq con EtOAc; G, germinación; VE, velocidad de emergencia o vigor germinativo; LT, longitud de tallo; LR, longitud de raíz; (-), sin efecto; (↓↓), marcada disminución; (↓), disminución; (↑), aumento; (*), diferencias significativas de cada tratamiento vs. control ($p < 0,001$).

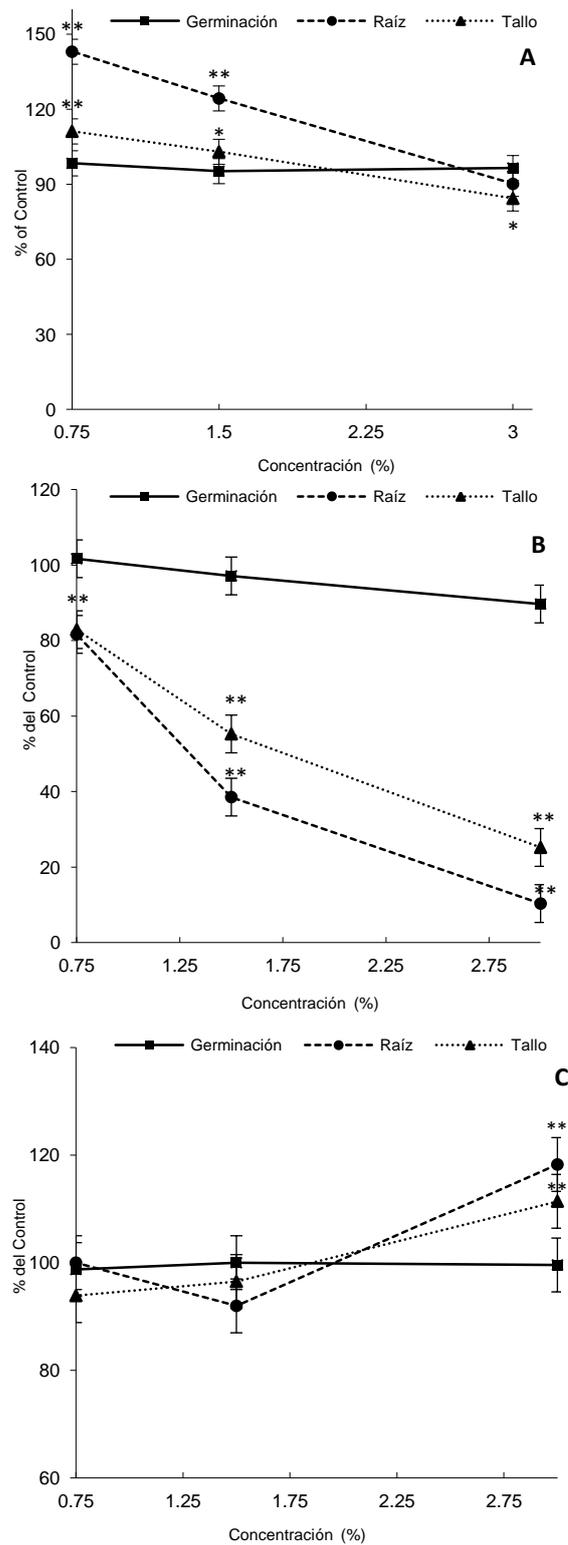


Figura 4.5. Bioactividad de las distintas concentraciones de los extractos acuosos de hojas (A), flores (B) y raíces (C) de *F. oolepis* sobre la germinación y el crecimiento de raíz y tallo de *L. sativa*. Los puntos representan medias entre bioensayos independientes ($n=3$). (*) y (**) indica diferencias significativas con el control ($p<0,05$ y $p<0,01$, respectivamente).

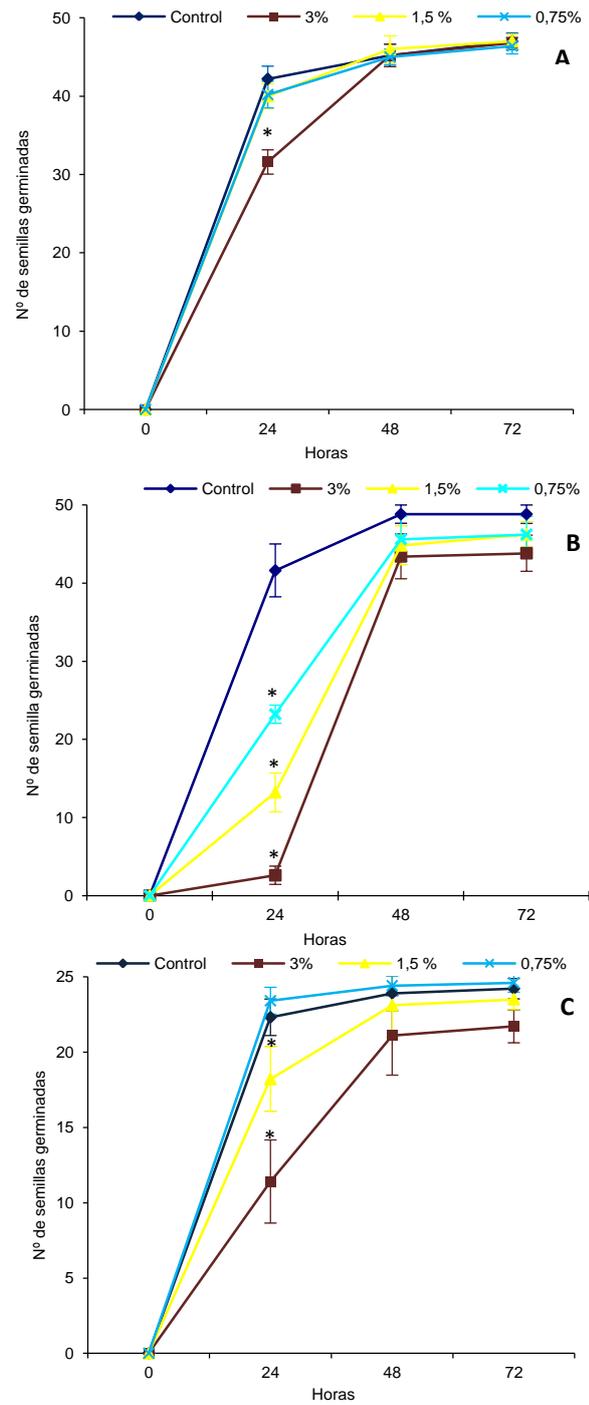


Figura 4.6. Bioactividad de los extractos acuosos de hoja (A), flor (B), raíz (C) de *F. oolepis* sobre la germinación *L. sativa*. Germinación acumulada por 72 h de tratamiento. (*) indican diferencias significativas respecto al control ($p < 0,01$).

4.3.4.- Bioactividad de la fase apolar (EAc) de la partición de EAq de *F. oolepis* con EtOAc

La fase apolar (EAc) obtenida por partición de los EAq de hoja de *F. oolepis* con EtOAc sólo afectó el crecimiento del tallo y de raíz de *L. sativa*, observándose variaciones en el efecto dependiendo de la concentración de los mismos (Tabla 4.2 y Figura 4.7).

Los EAc equivalentes a EAq al 3 % ($1,35 \text{ mg ml}^{-1}$) inhibieron la elongación del tallo y de raíz en un 40 y un 80 %, respectivamente ($p < 0,01$) y, a diferencia de lo observado en los EAc de hoja de *F. campestris*, no se observaron cambios en la morfología externa de la raíz de *L. sativa*. En los EAc más diluidos se hallaron diversos patrones de respuesta dependiendo del parámetro medido, en raíz se observó que sólo la concentración más diluida tuvo un efecto estimulante de la elongación, promoviendo en un 40 % ($p < 0,01$) la longitud de la misma, mientras que en tallo las diluciones correspondientes a EAq de 1,5 y 0,75 % ($0,9$ y $0,45 \text{ mg ml}^{-1}$), inhibieron la elongación en un 20 % con respecto a los controles ($p < 0,01$, Figura 4.7).

Todas las concentraciones de EAc de la fracción hojas retrasaron la emergencia de la radícula de lechuga las primeras 24 h. Los extractos más concentrados (equivalentes al 3 % de EAq) mantuvieron un leve efecto inhibitorio (77 % de semillas germinadas vs. control) durante las primeras 48 h. En las otras concentraciones, el efecto disminuyó a las 48 h, alcanzando valores de germinación de 93 % vs. control. Transcurridas las 72 h no se observaron diferencias significativas entre el número de semillas germinadas en los distintos tratamientos y los controles (Figura 4.8).

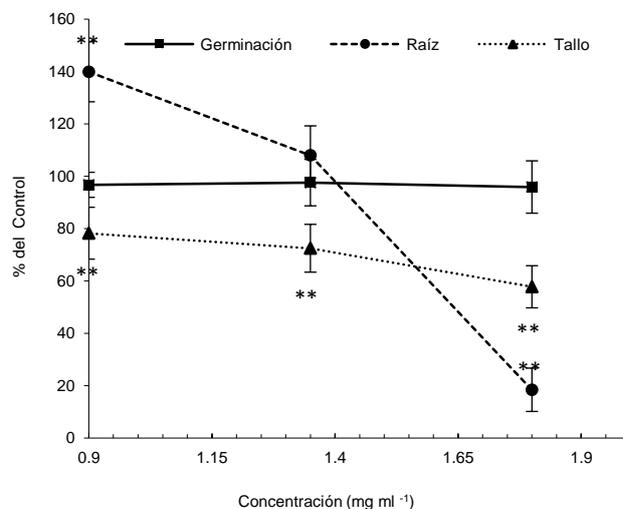


Figura 4.7. Bioactividad de las distintas concentraciones de los EAc de hoja de *F. oolepis* sobre la germinación y el crecimiento de raíz y tallo de *L. sativa*. Los puntos representan medias entre bioensayos independientes ($n=3$). (*) indican diferencias significativas con el control ($p < 0,01$).

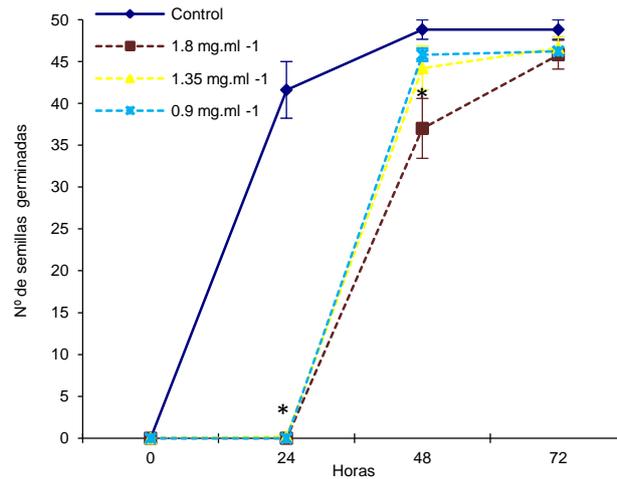


Figura 4.8. Efecto de las distintas concentraciones de los EAc de hojas de *F. oolepis* sobre la germinación de *L. sativa*. Germinación acumulada por 72 h de tratamiento. (*) indica diferencias significativas con el control ($p < 0,01$).

4.3.5.- Bioactividad de los aceites esenciales de *F. campestris*

No se observaron efectos fitotóxicos de los AcEs de *F. campestris* sobre *L. sativa*. En todas sus concentraciones, presentaron efectos estimulantes de la elongación de la raíz de *L. sativa*. El mayor efecto se observó a 0,5 y 1,5 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (500 y 1500 ppm). Estas diluciones provocaron un incremento de la longitud del 170 % con respecto a los controles ($p < 0,01$). Si bien la concentración de 1,0 $\mu\text{l ml}^{-1}$ mantuvo el efecto estimulante (100 % vs control), éste fue significativamente menor que el de las otras concentraciones (Figura 4.9, $p < 0,01$).

Con respecto a la velocidad de germinación, sólo en las primeras 24 h se observó un retraso en la emergencia de la radícula. En todas las cápsulas tratadas con las distintas concentraciones de los AcEs, transcurrido este período, no se hallaron diferencias significativas respecto a los controles (Figura 4.10). Los AcEs de *F. campestris* no presentaron efecto sobre la germinación total de *L. sativa*.

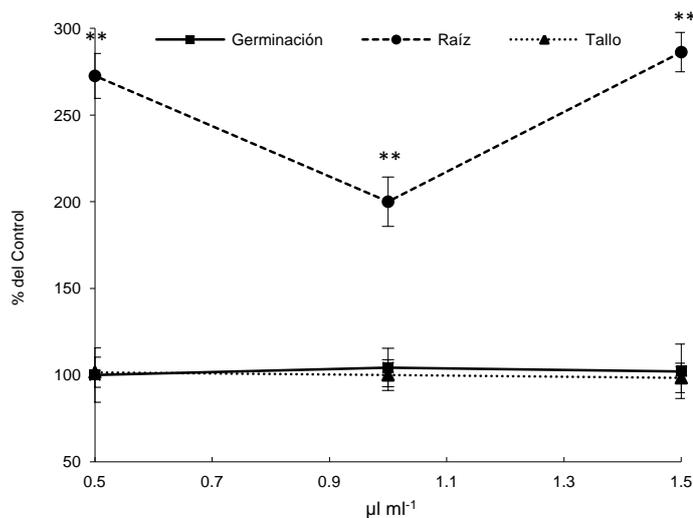


Figura 4.9. Bioactividad de las distintas concentraciones de los aceites esenciales de hoja de *F. campestris* sobre la germinación y el crecimiento de raíz y tallo de *L. sativa*. Los puntos representan medias entre bioensayos independientes ($n=3$). Las concentraciones de 0,5 a 1,5 $\mu\text{l ml}^{-1}$ se corresponden con 500 a 1500 ppm; (*) indican diferencias significativas con el control ($p < 0,01$).

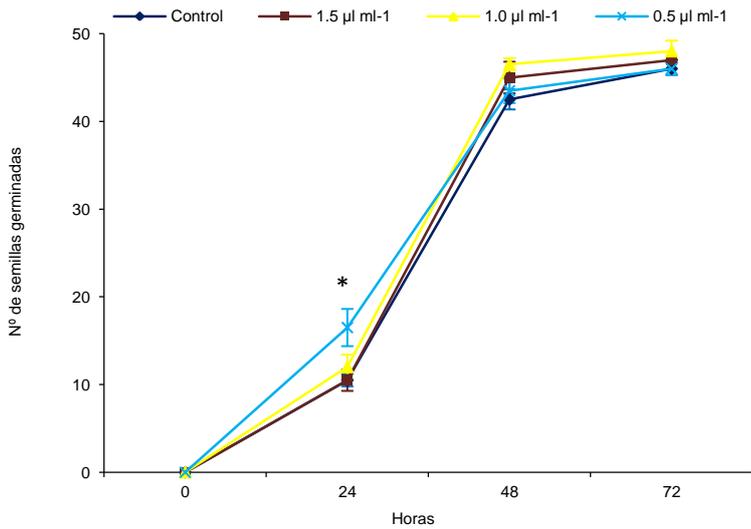


Figura 4.10. Efecto de las distintas concentraciones de los aceites esenciales de hoja de *F. campestris* sobre la germinación *L. sativa*. Germinación acumulada por 72 h de tratamiento. Las concentraciones de 0,5 a 1,5 µl ml⁻¹ se corresponden con 500 a 1500 ppm; (*) indican diferencias significativas con el control ($p < 0,01$).

4.3.6.- Bioactividad de los aceites esenciales de *F. oolepis*

Los AcEs de hojas de *F. oolepis*, en todas sus diluciones, presentaron un efecto inhibitorio de la elongación de tallo de *L. sativa* (entre 10 y 20 % vs control, $p < 0,01$). En raíz se observó un patrón diferente, a concentraciones de 0,5 µl ml⁻¹ (500 ppm) el efecto fue promotor de la elongación, de un 25 % con respecto al control ($p < 0,01$), mientras que en las cápsulas tratadas con una concentración de 1,5 µl ml⁻¹ (1500 ppm) el efecto fue inverso, hallándose una disminución de la longitud de raíz de un 40% ($p < 0,01$). Las radículas de semillas tratadas con una concentración intermedia (1,0 µl ml⁻¹ o 1000 ppm) no mostraron diferencias significativas en relación a los controles (Figura 4.11).

Con respecto a la velocidad de germinación, sólo en las primeras 24 h se observó un retraso en la emergencia de la radícula. En todas las cápsulas tratadas con las distintas concentraciones de los AcEs, transcurrido este período, no se hallaron diferencias significativas respecto a los controles.

Los AcEs de *F. oolepis* no presentaron efectos sobre la germinación total de *L. sativa*.

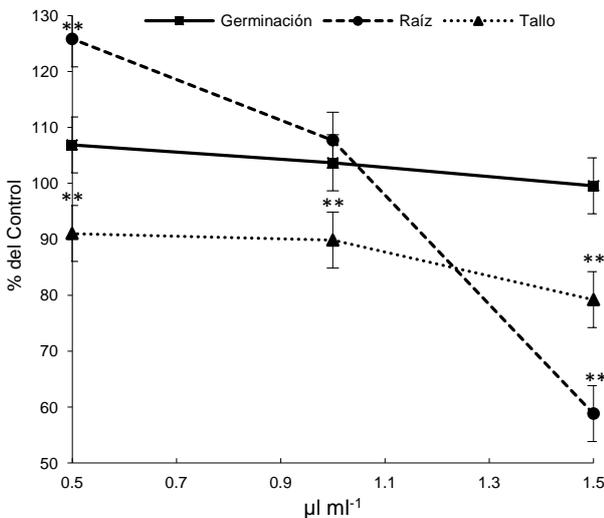


Figura 4.11. Bioactividad de los aceites esenciales de hoja de *F. oolepis* sobre la germinación y el crecimiento de raíz y tallo de *L. sativa*. Los puntos representan medias entre bioensayos independientes ($n=3$). Las concentraciones de 0,5 a 1,5 µl ml⁻¹ se corresponden con 500 a 1500 ppm; (*), diferencias significativas con el control ($p < 0,01$).

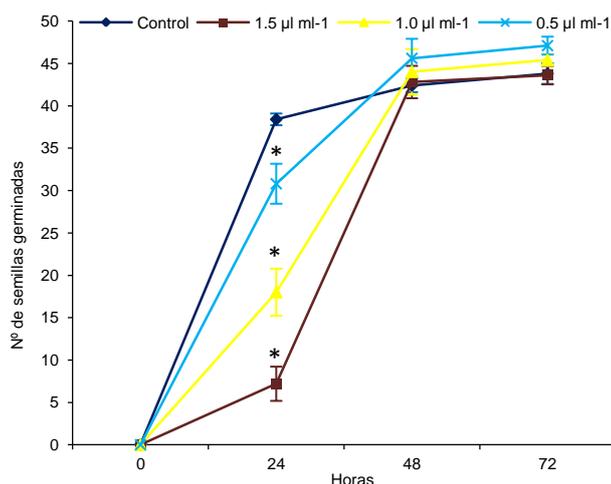


Figura 4.12. Efecto de las distintas concentraciones de los aceites esenciales de hoja de *F. oolepis* sobre la germinación acumulada de *L. sativa*. Las concentraciones de 0,5 a 1,5 µl ml⁻¹ se corresponden con 500 a 1500 ppm; (*), diferencias significativas respecto al control ($p < 0,01$).

4.3.7.- Caracterización fisicoquímica de los EAq de *F. campestris* y *F. oolepis*

La composición química de los EAq dependió del órgano estudiado, siendo similar en ambas especies (Tabla 4.3).

EAq 3 %	pH		Conductividad (µS cm ⁻¹)		STD (ppm)	
	FC	FO	FC	FO	FC	FO
Hojas	5,30	5,40	2720	2294	1356	1151
Semillas	6,79	6,63	226	252	113	126
Raíces	ND	ND	1000	1100	ND	ND
Flores	5,00	5,30	1650	1800	850	920

Tabla 4.3: Caracterización fisicoquímica de los extractos acuosos de *Flourensia campestris* (FC) y *Flourensia oolepis* (FO). Valores medios hallados entre dos extractos de cada órgano. ND: no determinado.

4.4.- DISCUSIÓN

Los procesos de lixiviación de compuestos fitotóxicos de las plantas son de particular interés en regiones áridas y semiáridas como la estudiada, en donde la germinación se halla estrictamente controlada por la temperatura y las precipitaciones estacionales. En los casos de *F. campestris* y *F. oolepis*, dos especies nativas adaptadas a ambientes áridos, el lavado de sus hojas y órganos durante las lluvias, o la emanación de compuestos volátiles, podrían ejercer un importante efecto sobre la germinación del banco de semillas, facilitando así su competencia en estos medios limitados de recursos. La mayoría de los metabolitos secundarios de las plantas con actividad fitotóxica, y que puedan ser relacionados con efectos alelopáticos, han sido aislados a partir de sus extractos acuosos y aceites esenciales, cuya actividad biológica fuera comprobada previamente a través de bioensayos. Teniendo como meta evaluar la presencia de compuestos fitotóxicos en *F. campestris* y *F. oolepis* se planteó como objetivo del presente medir la bioactividad de sus extractos sobre especies vegetales, desde una óptica ecofisiológica pero sin descartar sus potenciales como fuentes de herbicidas naturales. Se buscaron efectos fitotóxicos de extractos acuosos suaves y de aceites esenciales de ambas especies sobre *L. sativa*, una especie sensible ampliamente utilizada para estos propósitos.

Los tres parámetros seleccionados (germinación, crecimiento de raíz y tallo) para evaluar la actividad fitotóxica de *F. campestris* y *F. oolepis* sobre *L. sativa* mostraron

diversos patrones de respuesta, dependiendo de la especie y del órgano involucrado. Se detectaron potentes efectos fitotóxicos en los EAq del género *Flourensia* estudiados, siendo el crecimiento de raíz la variable más sensible, seguida por el crecimiento de tallo y la germinación. La inhibición drástica del crecimiento de la raíz (70 %) y del tallo (40 a 50 %) se logró en la mayoría de los bioensayos con EAq y EAc tanto de *F. campestris* como de *F. oolepis*. Los EAq y EAc de hoja y los EAq de flor, de *F. campestris* y *F. oolepis*, fueron las fracciones más efectivas, las que presentaron un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *L. sativa*.

Los EAq de hojas de *F. campestris* mostraron el mayor efecto fitotóxico sobre la germinación y sobre el crecimiento de lechuga, lo cual sugiere que éste sería el órgano ideal para la aislación e identificación del aleloquímico responsable. En EAq de *F. oolepis* no se detectó esta bioactividad sobre la germinación de *L. sativa*. El efecto inhibitorio diferencial entre *F. campestris* y *F. oolepis*, podría guardar relación directa con las variaciones ambientales características de los sitios (como tipo de suelo, radiación, lluvias, temperatura, etc.) donde cada una de las especies crece (Chou 1999, Cippolini y Bergelson 2000, Viator et al. 2006), pudiendo deberse a diferencias en la concentración propia del compuesto bioactivo (si se trata del mismo compuesto en ambas especies) o a una diferencia de actividad biológica específica de especie, si se tratara de aleloquímicos diferentes en cada especie.

Como datos complementarios, y para descartar posibles efectos osmóticos en los EAq de cada órgano y de ambas especies se determinó: la concentración salina, los sólidos totales disueltos y el pH. La composición química de los EAq dependió del órgano estudiado, siendo similar en ambas especies (Tabla 4.3). Al comparar estos parámetros con los sugeridos para agua de riego (grado de restricción entre ligero a moderado, conductividad $< 3000 \mu\text{S cm}^{-1}$, STD $< 2000 \text{ ppm}$) los valores hallados serían aptos para los bioensayos de germinación. Con respecto al pH, para lechuga, se recomienda un rango entre 5,5 y 7. En los EAq de flores de *F. campestris* se encontraron valores (pH = 5) un poco alejados del rango óptimo, sin embargo los valores de pH realmente considerados desfavorables son aquellos que se encuentran por debajo de 4,5, no encontrando estos valores en ninguno de los EAq utilizados (Metcalf y Eddy 1986). En base a estos resultados descartamos que los efectos fitotóxicos de los EAq se debieran a factores inespecíficos propios de la composición fisicoquímica de los mismos.

Además, como prueba de lo anterior, el hecho de que la bioactividad encontrada en los EAq se halle preservada en la fase apolar de la partición con EtOAc, es decir en los EAc, sugiere que los componentes responsables de los efectos fitotóxicos son metabolitos secundarios. En los bioensayos realizados con EAc de *F. campestris*, el crecimiento de las raíces de *L. sativa* comparado con las controles fue mínimo ($< 10 \%$) o nulo, observándose ápices radicales oscuros y/o necrosados, con raíces delgadas y rectas, con escasos pelos absorbentes. Raíces con estas anomalías morfológicas son características de semillas germinadas o de plántulas crecidas en contacto con aleloquímicos (Gniazdowska y Bogatek 2005, Lotina-Hennsen et al. 2006, Gatti et al. 2010). Este tipo de cambios en la morfología radicular nos ofrece una importante información en cuanto al modo específico de acción del compuesto o de la mezcla de compuestos (sinergismos) con efecto alelopático. A modo de ejemplo, ensayos realizados con concentraciones superiores a $50 \mu\text{M}$ de leukamenin E (aislado de *Isodon racemosa*), demostraron que este diterpeno produce alteraciones en el índice mitótico, inhibiendo la división celular, resultando en una disminución del desarrollo y de la producción de pelos radicales y raíces en *Lactuca sativa* (Lan Ding et al. 2008). Numerosos estudios informan que la presencia de sustancias alelopáticas pueden inducir

cambios en el índice mitótico. (Dayan et al. 1999, Jacobi y Fleck 2000, Pires et al. 2001, Iganci et al. 2006). En base a las anomalías radicales encontradas, se podría inferir que los efectos fitotóxicos provocados por *Flourensia* estarían mediados por un mecanismo de acción similar al de *I. racemosa*, aunque mayores estudios se están realizando al presente para esclarecer estos hechos.

Al igual que lo observado en raíz, los EAc de hoja de *F. campestris* mantuvieron el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de tallo, registrándose una disminución de la elongación de los mismos entre 40 a 85 % (Figura 4.3). Sin embargo, para lograr efectos inhibitorios similares a los obtenidos en raíz, fueron necesarias concentraciones ligeramente superiores de EAc. Estos resultados demuestran que en materia de crecimiento inicial, la raíz primaria de plántulas de *L. sativa* fue el parámetro de mayor sensibilidad a la hora de cuantificar el efecto alelopático de los extractos de hoja de *F. campestris*. Estos datos concuerdan con numerosos estudios en otras especies, donde se demostró que el crecimiento radicular presenta una mayor sensibilidad en plantas que crecen en presencia de compuestos alelopáticos (Hamdi et al. 2001, Parvez et al. 2003, Punjani et al. 2006, Abdelgaleil y Hashinaga 2007, Ercoli et al. 2007).

Si bien todos los órganos de una planta poseen potencial alelopático, el efecto inhibitorio puede variar dependiendo del órgano involucrado (Edrisi y Farahbakhsh 2011), debido a que numerosos son los pasos que intervienen en la formación, acumulación, movimiento y metabolismo de estos compuestos (Seigler 2006). El efecto inhibitorio diferencial de los EAq de hoja, flor, raíz y semilla, en ambas especies, es un indicativo de que en estas fracciones el compuesto o grupo de compuestos con actividad fitotóxica se hallaría en distintas proporciones.

La germinación total de semillas de lechuga se redujo significativamente en las concentraciones superiores de los EAq y EAc de *F. campestris*, llegando a un máximo de inhibición del 98 %. En la actualidad, sólo el trabajo de Palacios et al. (2010) puso a prueba el efecto fitotóxico de *F. campestris* mediante extractos etanólicos de sus hojas. Dicho trabajo muestra que una concentración final de 5 mg ml⁻¹ en los bioensayos no tuvo efectos significativos sobre la germinación de semillas de *Avena sativa* ni de *Raphanus sativus* (5,8 y 11,6 % de inhibición, respectivamente). En contraste, encontramos una potente inhibición de la germinación de semillas y del crecimiento de raíz y tallo de *L. sativa* (Silva et al. 2012), cuando éstas se incubaron con extractos etanólicos de hojas secas de *F. campestris* a 5 y 10 mg ml⁻¹ (obtenidos siguiendo la metodología descrita por Palacios et al. 2010). En los bioensayos en el laboratorio se obtuvo una reducción en la germinación de un 70 y un 93 %, respectivamente. La concentración más baja (5 mg ml⁻¹) inhibió drásticamente la elongación de raíz y tallo entre 85 y 96 %, respectivamente, mientras que la concentración de 10 mg ml⁻¹ arrestó por completo el crecimiento (Silva et al. 2012). A modo de contraprueba, se repitieron los ensayos mostrados por Palacios et al. (2010) y se corroboraron sus resultados. Con una concentración de 5 mg ml⁻¹ del extracto etanólico de hojas de *F. campestris* no se detectó inhibición significativa de la germinación de *Avena sativa* ni de *Raphanus sativus* (7 y 0 %, respectivamente), mientras que los mismos extractos provocaron una inhibición de la germinación del 70 % de semillas de lechuga en las mismas condiciones. Estas diferencias se deberían a actividades biológicas específicas de cada especie, que ya habían sido detectadas en nuestro laboratorio con otras especies estudiadas (resultados no mostrados). Sin embargo, cabe destacar que *F. campestris* mostró un marcado efecto inhibitorio en el crecimiento de raíz y tallo de la avena y el rabanito (resultados no mostrados), una variable que no fue estudiada por Palacios et al. (2010). De manera similar, extractos acuosos al 6 % de hojas de *F. campestris* no fueron capaces de inhibir significativamente la germinación de avena y rabanito, aunque sí

mostraron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de sus raíces y tallos (resultados no mostrados). Estos estudios serán reforzados mediante bioensayos sobre estas especies utilizando el compuesto biológico aislado de *F. campestris* con demostrada actividad herbicida sobre lechuga. En este sentido, y con el objetivo de explorar el potencial de *F. campestris*, se están llevando a cabo nuevos bioensayos sobre malezas y especies cultivables, un amplio campo de estudio que surge como una de las proyecciones de la presente tesis doctoral.

Los EAc provenientes de hojas de *F. oolepis* al 3 %, afectaron el crecimiento de raíz hasta un 80 %, el crecimiento de tallo hasta un 40 %, y no se observaron cambios significativos en el total de semillas germinadas de *L. sativa* (Tabla 4.2). Cabe destacar que a diferencia de lo hallado en *F. campestris*, en ninguno de los bioensayos con *F. oolepis* se observaron cambios en la morfología externa de la radícula de *L. sativa*. Palacios et al. (2007) pusieron a prueba el efecto de extractos etanólicos (10 mg ml^{-1}) y dos particiones del mismo con metanol:hexano (1:9) de hojas de *F. oolepis* sobre la germinación de *A. sativa* y *R. sativus*. Estos autores demostraron que los tres extractos presentan un potente efecto inhibitorio, ya que logran bloquear la germinación de *A. sativa* y *R. sativus* entre un 100 y 93,3 %, respectivamente. La diferencia con nuestros resultados radica fundamentalmente en los procesos de extracción utilizados. Teniendo en cuenta los métodos de extracción con solventes utilizados por Palacios et al. (2007) y sus resultados, en comparación con los encontrados mediante extractos acuosos suaves, se podría especular que los compuestos con actividad fitotóxica detectados por dichos autores no tendrían relación con efectos alelopáticos de la especie. Asimismo, diferencias de actividad biológica específicas de especie para *F. oolepis* tampoco pueden ser descartadas hasta el presente.

Como se ha mencionado, la fracción correspondiente a los AcEs de plantas es también una abundante fuente de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica (Weidenhamer et al. 1993, Dayan y Duke 2006, Mancini et al. 2009).

Contrariamente a lo esperado, los AcEs de *F. campestris* mostraron interesantes efectos estimulantes sobre el crecimiento de raíz de *L. sativa* (Figura 4.9). No se hallaron efectos significativos sobre la elongación del tallo ni sobre la germinación de *L. sativa*.

Los AcEs de *F. oolepis* presentaron diferentes patrones de acción sobre los crecimientos de raíz y tallo de *L. sativa*. Todas sus diluciones afectaron de modo negativo la longitud de tallo. En raíz, sólo mostró efectos inhibitorios la concentración más alta (1500 ppm), en cambio las concentraciones menores produjeron una estimulación de la elongación. Al igual que en *F. campestris*, los AcEs de *F. oolepis* no presentaron efectos significativos sobre la germinación total de *L. sativa*. (Figura 4.11).

La mayoría de los compuestos presentes en los AcEs son no polares, por ende prácticamente insolubles en agua. Es por ello que el estudio del efecto de estos compuestos en medio acuoso sobre la germinación de otras especies, podría no necesariamente explicar la ecología química de las plantas en estudio, pero sí podría revelar la acción fitotóxica de algún componente con potencial uso como agente herbicida. Trabajos recientes sugieren que los compuestos volátiles, producidos en las hojas, podrían contribuir en las interacciones entre plantas, y con otros organismos en la rizósfera, mediante la unión de estos compuestos a las partículas del suelo o por absorción directa de las plántulas en desarrollo (Weston 2005). Numerosos autores han utilizado solventes de transferencia (acetona 1 % v/v) que no presentan efectos adversos en los bioensayos (Weidenhamer et al. 1993, Dayan y Duke 2006, Mancini et al. 2009). Como fue en nuestro caso, también muchos autores aplican los AcEs disueltos en solventes no polares en las cápsulas de Petri, evaporando el solvente antes de la adición

de las semillas y el agua (e.g., Dornbos y Spencer 1990, Razavi y Nejad-Ebrahim 2010), resultando la disolución y la concentración de estos compuestos indeterminados en los ensayos. Otra maniobra para incrementar la solubilidad de los AcEs en ensayos acuosos, y que no presenta efectos fisiológicos adversos, es adicionar hasta un 2% de SDS (Tanrisever et al. 1987, Fischer et al. 1988) tanto en los tratamientos como en los controles, siendo éste último el propuesto y utilizado en nuestro laboratorio (SDS 0.1 %). Por otro lado, la solubilidad parcial de los AcEs en agua es un hecho, como así lo demuestran las diferencias en el rendimiento y la composición de los mismos mediante la hidrodestilación (donde una porción de los mismos queda disuelta en agua y puede luego extraerse con solventes), y la destilación por arrastre con vapor y otras técnicas, como ha sido comprobado y discutido en numerosos trabajos, siendo esto dependiente del tipo de compuestos presentes y por ende de la especie en estudio (El Amine Dib et al. 2010, Nezhadali y Zarrabi Shirvan 2010, Safaei-Ghomi y Meshkatalasada 2010).

Por último, es fácil comprobar la existencia de compuestos apolares en extractos acuosos de vegetales mediante extracción con solventes. Su disolución estaría facilitada por emulsificantes naturales o bien por la propia interacción de metabolitos secundarios con estructura anfipática con otros prácticamente apolares. El carácter apolar de estos compuestos les permitiría permanecer en suelo al no ser arrastrados por el agua e ingresar más fácilmente a través de membranas biológicas a fin de ejercer su acción.

Los datos obtenidos en este capítulo sobre los AcEs de *F. campestris* y *F. oolepis* serán reforzados con nuevos bioensayos con dosis más altas y con semillas de otras especies vegetales. El estudio de la identidad de los compuestos químicos volátiles de estas fracciones aportará también valiosos datos sobre su posible participación en la ecofisiología de estas especies.

4.5.- CONCLUSIONES

Se ha demostrado que los EAq de hojas de *F. campestris* poseen un potente efecto fitotóxico sobre la germinación y el crecimiento de raíz y tallo de *L. sativa*. Este efecto fue menor pero se halló también presente en otros órganos de la planta. En EAq de *F. oolepis* los efectos fitotóxicos fueron menores y limitados solo al crecimiento de *L. sativa*. Los componentes responsables de los efectos fitotóxicos en los EAq fueron extraídos con solventes (EtOAc), revelando así que forman parte de los metabolitos secundarios. Los AcEs de ambas especies no mostraron efectos fitotóxicos, aunque no se descartan posibles efectos fitotóxicos de estas fracciones sobre otras especies vegetales. El potente efecto fitotóxico observado en EAq suaves de hojas de *F. campestris* sugiere fuertemente su participación en procesos alelopáticos, participando con especial relevancia en la preservación y perpetuidad de esta especie nativa en su hábitat natural. La aislación e identificación del compuesto fitotóxico responsable, y el estudio de su actividad biológica en diferentes especies, se proponen como de gran potencial no sólo para el conocimiento de la ecofisiología de estas especies sino también para su aplicación en el campo de la agroindustria.

Capítulo 5

Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica en *F. campestris* y *F. oolepis*

Parte de estos resultados han sido publicados (Silva et al. 2012).

5.1.- INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior, se describe el hallazgo de un potente efecto fitotóxico en extractos acuosos de *F. campestris*, que se mantiene en la fracción apolar cuando estos extractos son particionados con solventes (EtOAc), lo que indica que los aleloquímicos responsables son metabolitos secundarios. El hallazgo de efectos fitotóxicos en extractos acuosos suaves (< 4 %, 24 h a 22 °C), obtenidos en condiciones similares a las que se encuentran expuestas las plantas en su ambiente natural, provee evidencias acerca del importante rol que juegan estos mecanismos en el mantenimiento de las poblaciones naturales. En este capítulo se expone la segunda etapa del trabajo de tesis en relación a la participación de mecanismos alelopáticos en la ecofisiología de *F. campestris* y *F. oolepis*: la aislación e identificación de los metabolitos secundarios responsables de los efectos fitotóxicos observados en *Flourensia* (Silva et al. 2012).

Las plantas poseen una gran variedad de compuestos químicos que no intervienen en los procesos metabólicos o rutas de biosíntesis primarias: los metabolitos secundarios. Éstos constiuyen un elemento necesario y representan una ventaja competitiva, ya que son sintetizados por las plantas como defensa contra herbívoros y patógenos, en la fotoprotección ante la exposición crónica a altas irradiancias (UV-B), como señalización para agentes polinizadores y dispersores y en la interacción planta-planta (alelopatía) (Lydon y Duke 1993, Harborne 1999, Harborne y Williams 2000, Mazza et al. 2000, Pichersky y Gershenzon 2002, Kliebenstein 2004). Cabe aquí diferenciar específicamente a la competencia como un mecanismo por el cual las plantas pugnan por un mismo elemento (nitrógeno, agua, etc.), mientras que la alelopatía se refiere a la acción que una planta puede tener sobre otra o sobre otro ser vivo. Los metabolitos secundarios son a su vez de importancia agrícola y comercial, pues presentan incontables aplicaciones en las industrias químicas, como fármacos, colorantes, perfumes, conservantes, insecticidas, fungicidas, bactericidas, herbicidas, etc. Gran parte de esta demanda está directamente relacionada con la agroindustria debido al crecimiento que ha experimentado la producción orgánica en los últimos años. Frecuentemente, el control de malezas desarrolló estrategias de manejo que han producido con el tiempo una mayor contaminación de las aguas subterráneas, un incremento de la mortalidad de organismos no relacionados y la aparición de biotipos resistentes (Powles y Holtum 1994, De Prado et al. 1997, De Prado y Jorriin 2001, Powles y Shaner 2001), generando la necesidad de nuevos compuestos bioactivos de origen natural. Históricamente, los metabolitos secundarios, han sido una fuente valiosa de pesticidas, siendo empleados en forma directa como preparaciones crudas, como compuestos puros o como guías en el desarrollo de pesticidas sintéticos.

Los metabolitos secundarios provienen de unidades estructurales formadas en el metabolismo primario. Las estructuras más importantes involucradas en la biosíntesis de metabolitos secundarios pueden derivar de los intermediarios del acetyl-coenzima-A, ácido shikímico y ácido mevalónico, utilizados en las vías de síntesis del acetato, shikimato y mevalonato, respectivamente. A partir de estas tres rutas biosintéticas se producen compuestos fenólicos, terpenicos y nitrogenados (Harborne 1991).

Los compuestos fenólicos de amplia difusión en la naturaleza pertenecen en su mayoría a la vía del acetato. En la vía del shikimato se producen lignanos, cumarinas, flavonoides, alcaloides y fenoles, mientras que la vía del mevalonato es responsable de la biosíntesis de terpenoides y esteroides. Si bien éstas son las principales vías de síntesis, los metabolitos secundarios también pueden originarse por la combinación de varias unidades estructurales de diferentes vías (Dewick 2002).

En el género *Flourensia*, los componentes sesquiterpénicos derivados del bisaboleno y lactonas sesquiterpénicas han sido propuestos para establecer la quimiosistemática del

género (Uriburu et al. 2005), así como los prenilflavonoides y derivados del benzofurano (Uriburu et al. 2004, 2007). Los terpenoides son un grupo importante de compuestos con gran potencial aleloquímico, debido a la amplia gama de interacciones biológicas en las que interviene (Goodwin 1971) y a su extensa distribución en la naturaleza. Se hallan formados por un esqueleto carbonado derivado de las uniones cabeza-cola de unidades de isopreno (C5). Se clasifican como hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterpenos (C25), triterpenos (C30) y tetraterpenos (C40). Desde el punto de vista biogenético derivan de tres moléculas de acetil-CoA, que luego de una serie de reacciones (hidrólisis, reducción, fosforilación, etc.) forman el ácido mevalónico, que posteriormente se transforma en geranyl pirofosfato. Esta molécula de diez átomos de carbono es la que da lugar a un conjunto de monoterpenos lineales los cuales pueden ser hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, ésteres y acetatos, encontrados como componentes de aceites esenciales. La adición de una unidad C5 produce el precursor fundamental de los sesquiterpenos: el farnesil pirofosfato. La diversidad de estructuras presentes en los sesquiterpenos es superior a la que poseen los monoterpenos y los diterpenos, debido a la mayor flexibilidad conformacional de los anillos de 10 y 11 miembros, respecto a los de seis que se presentan en mono- y diterpenos (Dewick 2002).

Tanto los sesquiterpenos como los monoterpenos son los compuestos más frecuentes involucrados en las interacciones alelopáticas, sin embargo la gran variabilidad estructural y el gran número de compuestos similares dificulta muchas veces la identificación de las estructuras responsables de la bioactividad. Los sesquiterpenos de cadena abierta han sido reportados como aleloquímicos, entre ellos podemos destacar al farnesol, nerolidol, helianeno y heliespirano, así como derivados del: bisaboleno (beta-bisaboleno), guaiano (alfa-bulnesene), aromadendeno ((+)-espatulenol) y eudesmaneno (ciperol y ciperoneno) (Macias et al. 1998).

En una revisión de más de 700 flavonoides isoprenilados, Barron e Ibrahim (1996) destacan al género *Flourensia* como uno de los 5 más importantes dentro de las Asteraceae en relación con la acumulación de este tipo de compuestos. Estudios previos en resinas, aceites esenciales y extractos vegetales del género han demostrado la existencia de metabolitos secundarios con un amplio espectro de actividades biológicas, contra insectos (Faini et al. 1997, García et al. 2007, Diaz Napal et al. 2009), fitotóxica (Mata et al. 2003, Palacios et al. 2007) y fungicida, alguicida y antitermitas (Tellez et al. 2001). Los metabolitos descritos en *F. oolepis* comprenden sesquiterpenos, flavonoides, benzofuranos y cumarinas (Guerreiro et al. 1979, Uriburu et al. 2002, Diaz Napal et al. 2009), mientras que en *F. campestris* corresponden a derivados de la p-hidroxiacetofenona (benzofuranos, vía del acetato) y flavonoides (flavanonas preniladas, agliconas y dihidroflavonoles, vía del shikimato/acetato), sin detectarse la presencia de lactonas (Correa et al. 1971, Dillon y Mabry 1977, Mc Cormick et al. 1986, Fukay y Nomura 1990, Uriburu et al. 2004).

Los metabolitos secundarios pueden producirse en las plantas en forma constitutiva o ser inducidos por determinados factores de estrés (Cippollini y Bergelson 2004). Sin embargo, no se conoce en profundidad cómo el ambiente regula la producción de dichos principios activos, ni tampoco cómo éstos contribuyen al mantenimiento de las poblaciones naturales.

Hasta el presente, no se había explorado la potencial participación de los metabolitos secundarios en la ecofisiología de *F. campestris* y *F. oolepis*. El objetivo del presente estudio fue aislar e identificar los metabolitos fitotóxicos presentes en los extractos acuosos de *F. campestris*, así como su distribución en distintos órganos y poblaciones, tanto de *F. campestris* como de *F. oolepis*. Los extractos acuosos de hojas

de *F. campestris* (por ser los de mayor efecto fitotóxico) fueron fraccionados por ensayos biodirigidos, utilizando cromatografía líquida para el aislamiento y técnicas espectrales para la identificación. Se diseñaron técnicas simples de screening (TLC-2D) a fin de evaluar su presencia y concentración. También se identificaron los metabolitos secundarios presentes en los aceites esenciales de *F. campestris* y *F. oolepis*, que aunque no presentaron efectos fitotóxicos sobre *L. sativa*, no se descarta la presencia de compuestos con reconocida actividad sobre otras especies vegetales. Para ello se extrajo la fracción volátil de las hojas de ambas especies por absorción en fibras y se identificaron los compuestos por cromatografía gaseosa y técnicas espectrales.

Numerosas hipótesis fueron resolviéndose a lo largo del presente trabajo. Se planteó que los extractos acuosos de *F. campestris* poseen un metabolito secundario con potente acción fitotóxica, cuya concentración en cada órgano se correlaciona con los efectos fitotóxicos encontrados en los respectivos extractos. Este metabolito estaría también presente en *F. oolepis* pero en mucha menor concentración, como marcador quimiotaxonómico de la especie. En cuanto a la identidad química del compuesto bioactivo, se esperó aislar un terpenoide o un flavonoide, hallados frecuentemente involucrados en actividades fitotóxicas. Como potencial agente alelopático, se esperó encontrar cambios en su acumulación en plantas de distintas poblaciones, sometidas a distintas condiciones climáticas y de estrés abiótico. Dada su fácil extracción con agua, no se esperó encontrar su presencia entre los compuestos apolares de los aceites esenciales. Entre los compuestos volátiles de los aceites esenciales de *F. campestris* y *F. oolepis* se encuentran algunos de reconocida actividad fitotóxica contra otras especies vegetales distintas a *L. sativa*. La composición de los aceites esenciales sufre una amplia variación con la época de recolección de las plantas.

La identificación de metabolitos secundarios con propiedades fitotóxicas en especies vegetales permitirá entender el rol que estos principios activos juegan en el mantenimiento de las poblaciones naturales y valorar el potencial que poseen estas especies nativas como fuente de productos naturales para la agroindustria.

Cuestiones a abordar en el capítulo:

¿Cuál es la identidad química del compuesto fitotóxico? ¿Cómo varía el compuesto fitotóxico en los diferentes órganos (hoja, raíz y flores)? ¿Se encuentra este metabolito en *F. oolepis*? ¿Existen variaciones en la producción del compuesto entre las distintas especies y entre las diferentes poblaciones?, ¿Se encuentra el metabolito aislado en los aceites esenciales? ¿Cuál es la composición química de los compuestos volátiles de *F. campestris* y *F. oolepis*?

Para responder estos interrogantes se realizaron:

- a) Fraccionamientos biodirigidos para determinar la fracción cruda de metabolitos secundarios responsables de la bioactividad.
- b) Cromatografías líquida en columna, cromatografías en capa delgada, RMN (1-D y 2-D), IR y GC-MS para aislar e identificar el compuesto fitotóxico.
- c) GC-FID para cuantificar el compuesto fitotóxico en las diferentes especies, en los distintos órganos y poblaciones.
- d) TLC-2D para la identificación y semi-cuantificación rápida (screening) del compuesto fitotóxico.

e) Cromatografía gaseosa (GC-RIA-FID) y análisis por GC-MS para la identificación de compuestos volátiles en los aceites esenciales de hojas de ambas especies.

5.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1.- Material Vegetal

5.2.1.1 Área de Muestreo

F. campestris y *F. oolepis* fueron recolectadas (a menos que se halle especificado) desde octubre de 2007 a noviembre de 2009 en áreas naturales del valle de Punilla, provincia de Córdoba, Argentina (Capítulo 1 -Figuras 1.3 y 1.4-). Especímenes de *F. campestris* (BAA 26.498) y *F. oolepis* (BAA N°26.499) fueron depositados en el Herbario Gaspar Suarez de la Facultad de Agronomía, UBA. Los análisis de suelo de cada población muestreada se detallan en el ANEXO.

5.2.1.2 Muestreo

En cada sitio y para cada especie, se cosechó material de 10 individuos. El material vegetal fue secado a temperatura ambiente o en cámara entre 20-30° C, protegido de la luz solar de modo de no alterar la composición química del mismo. Se almacenó (previa separación de órganos enteros) en bolsas de papel en ambiente oscuro y seco hasta su procesamiento.

5.2.2.- Aislamiento y caracterización del metabolito secundario fitotóxico en extractos acuosos de hojas de *F. campestris*.

5.2.2.1 Fraccionamiento biodirigido

Las hojas secas de *F. campestris* (120 g) fueron extraídas con agua y se particionó con EtOAc como se describió anteriormente (Capítulo 4, sección 4.2.2.1. y 4.2.2.3.). La fase orgánica fue secada a 30 °C con corriente de nitrógeno, dando como resultado una sustancia líquida densa de color verde (ca. 1 g). Este extracto fue fraccionado por cromatografía líquida en columna (CC) (d.i.: 1,5 cm, 47 cm; 50 g silica gel 60, 70-230 mesh, Merck) a un flujo de 5 ml min⁻¹ usando CHCl₃-EtOAc-MeOH (5:1:0,25; Solvente 1). Fracciones de 1 min fueron recolectadas y bioensayadas como se describió para extractos de EtOAc (Capítulo 4, sección 4.2.2.2.). Los compuestos presentes en estas fracciones fueron identificados mediante TLC (Silica gel 60, placas de aluminio, F₂₅₄, Merck) con Solvente 1 y reveladas bajo lámparas UV₂₅₄ y UV₃₆₅ y por tinción con vapores de I₂ (5-10 min a 50 °C). Las fracciones bioactivas (F1 (Fr. 34-48), ca. 100 mg) fueron combinadas, secadas y fraccionadas en el mismo sistema de CC utilizando tolueno-CHCl₃-EtOAc-MeOH (1:6:0.5:0.25). Las fracciones bioactivas (F2 (Fr. 80-100), ca. 50 mg) fueron posteriormente combinadas y fraccionadas mediante CC de 5 ml (i.d. 0,5 cm, 25 cm; 5 g silica) eluidas a 1 ml min⁻¹ usando tolueno-CHCl₃-EtOAc-MeOH-HOAc (1:6:0.5:0.15:0.15; Solvente 2), dando como resultado una fracción principal aislada F3 (Fr. 7-15). Previo al bioensayo, de manera de evitar los efectos del ácido en las fracciones sobre la germinación de las semillas, el HOAc de F3 fue removido lavando la muestra con CHCl₃ en CC de 1 ml y eluyendo con EtOAc-MeOH (50:50). Se obtuvo un total de 25 mg de F3 (0.02 % del peso seco inicial), una sustancia líquida densa incolora con un compuesto bioactivo puro revelado por TLC (R_f = 0.41, Solvente 1), de color celeste al UV₂₅₄, incoloro al UV₃₆₅ y fuertemente teñido con I₂.

Una masa de hojas frescas de *F. campestris* (400 g) equivalente al peso seco utilizado, considerando una pérdida del 70 % de su peso en el secado, fue extraído y procesado de la misma manera. Cada etapa del fraccionamiento fue similar en cuanto a rendimientos y resultados respecto a las hojas secas.

El fraccionamiento biodirigido e identificación de metabolitos secundarios ha sido desarrollado en nuestro laboratorio bajo la supervisión del Dr. Leonardo Piazza.

5.2.2.2.- Elucidación estructural del compuesto bioactivo

Los espectros de RMN 1-D (^1H , ^{13}C y DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)) y 2-D (HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)) fueron realizados en un equipo BRUKER FT-400 MHz, operando a 400 MHz en ^1H y 100 MHz en ^{13}C . Los corrimientos químicos fueron informados en partes por millón (ppm), tomado como referencia la señal residual del cloroformo-d a 7,26 ppm (^1H -RMN) y 77,16 ppm (^{13}C -RMN) (Gottlieb et al. 1997). Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertz (Hz).

El experimento de Cromatografía Gaseosa acoplada a espectrometría de masas, se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas marca SHIMATZU CGMS-QP 5000. La columna utilizada fue una HP 5% fenilmetilsilicona (Alltech) de 30 m x 0.32 mm.

La espectroscopía de infrarrojo se llevó a cabo en un equipo marca SHIMATZU FTIR-8501, sobre pastillas de KBr.

La medición de la rotación óptica se realizó en un Polarímetro marca JASCO P-1010. Se utilizó una celda de vidrio de 1 cm de longitud y 1,5 ml de acetona. Se utilizó una longitud de onda de 589 nm (línea del sodio).

5.2.3.- Cuantificación del compuesto bioactivo por GC-FID y TLC-2D.

5.2.3.1.- Preparación de las muestras

El material seco y molido de hojas, raíces e inflorescencias (50mg) de *F. campestris* (Río Pintos y El Dragón) y de *F. oolepis* (Los Terrones y El Cajón) fue extraído usando primero 1,5 ml y luego 0,5 ml de EtOAc, utilizando vortex por 2 min y centrifugando por 10 min a 300 g. Las fases de EtOAc fueron combinadas y secadas a 30° C bajo N_2 . El peso de los extractos ($N = 3$) fue de $11,4 \pm 1$, $5,5 \pm 0,7$ y $8,1 \pm 0,9$ % en relación al material seco molido de hoja, raíz e inflorescencia, respectivamente. En estos materiales el compuesto bioactivo se cuantificó por GC-FID y por TLC-2D.

Los aceites esenciales de ambas especies fueron obtenidos por hidrodestilación con cámara de extracción independiente como se señaló en el capítulo anterior (Capítulo 4, sección 4.2.3.1.). El compuesto bioactivo en estas fracciones fue determinado por TLC-2D.

5.2.3.2.- Cuantificación

5.2.3.2.1.- GC-FID

Los extractos de EtOAc fueron disueltos en 1ml de tolueno más BSTFA (950 μl + 50 μl , respectivamente) para su posterior análisis. El cálculo de la concentración del compuesto fitotóxico se realizó por GC-FID mediante una curva de calibración estándar. Se utilizó un equipo GC-FID (GC-hydrogen flame ionization detector, Agilent GC 6890) equipado con un inyector automático y una columna se ZB-5HT (15 m x 0,32 mm). La temperatura de inyección fue de 200 °C y se inyectaron 4 μl , con un Split de 10, el gas de corrida fue N_2 con un flujo de 2 ml min^{-1} . El programa comenzó con una

temperatura inicial de 60 °C y una rampa de 3 °C min⁻¹. La temperatura final fue de 290 °C (200-245 °C, 40 °C min⁻¹, 245 a 255 °C, 1 °C min⁻¹, 255-290 °C, 50 °C min⁻¹), que se alcanzó al cabo de 5 min, en un tiempo total de 18 min por muestra.

La curva de calibración se construyó con seis puntos con el compuesto puro (0,005—1,0 mg ml⁻¹). La cuantificación se realizó mediante la interpolación de las alturas de los picos de los cromatogramas obtenidos por GC (tiempo de retención: 5.8 min) respecto a la curva estándar construida por las alturas de los picos del compuesto bioactivo a cada concentración. La curva de calibración se realizó por triplicado mostrando una relación lineal en el intervalo utilizado ($r = 0,997$).

5.2.3.2.2.- TLC-2D

Para una identificación rápida y semi-cuantitativa del compuesto fitotóxico, se desarrolló una metodología en TLC-2D. Para esta técnica de detección se siembran dos muestras (el compuesto puro vs. extracto o extracto vs. extracto) en la parte inferior, pero en bordes opuestos, en placas de TLC (5.2.2.1) de 10 x 6.5 cm. Cada una de las siembras se corre en la misma dirección con sentidos opuestos con el Solvente 1 más 0,25 HOAc hasta que los frentes de corrida alcancen la mitad del cromatograma. A continuación, se corre en la dirección perpendicular utilizando el Solvente 2; las muestras migran en conjunto y ahora en la segunda dimensión. El compuesto bioactivo ($R_f = 0,35$) se revela como un spot celeste al UV₂₅₄ y se tiñe fuertemente con los vapores de I₂. Los resultados semicuantitativos obtenidos con esta simple metodología guardaron estrecha correlación con los obtenidos por GC-FID en todos los extractos ensayados.

5.2.4.- Caracterización de compuestos volátiles en hojas de *F. campestris* y *F. oolepis*

5.2.4.1.- Extracción

Los compuestos volátiles emitidos por hojas secas de *F. campestris* y *F. oolepis* fueron investigados mediante HS-SPME (head space-solid phase micro extraction), usando fibras rojas de 100 µm cubiertas con PDMS (polidimetil xiloxano). El material procesado fue obtenido en Diciembre de 2005 (primavera) y en Febrero de 2006 (verano) en las áreas naturales descritas para cada especie. Las muestras fueron mantenidas a 80 °C, equilibradas y extraídas durante 20 min. Para cada muestra, se realizaron al menos 3 replicados.

5.2.4.2.- Identificación

La identificación de los compuestos volátiles se realizó mediante el uso de un cromatógrafo gaseoso Shimadzu GC-RIA-FID con una columna de CBP-1 (30 m x 0,25 mm) y un GC-HP 5890 equipado con una columna DB-5 (vidrio-silica, 30 m x 0,25 mm de diámetro) conectado en línea a un espectrógrafo de masa MS-HP 5971A (70eV). Las temperaturas para GC y análisis por GC-MS partieron de 60° C hasta 260° C, 3° C min⁻¹, para el inyector y en el detector la temperatura fue de 280° C. El gas de corrida utilizado fue He (1 ml min⁻¹). La identificación de los componentes se basó en la comparación de los índices de retención (König et al. 2001) y la comparación con librerías espectrales de masa (NIST 2005).

5.3.- RESULTADOS

5.3.1.- Aislamiento y caracterización del metabolito secundario fitotóxico en extractos acuosos de hoja de *Flourensia campestris*.

Con el objetivo de identificar el compuesto responsable de los efectos fitotóxicos, los extractos acuosos de hojas secas de *F. campestris* fueron particionados con EtOAc, y a través de un fraccionamiento cromatográfico bio-guiado de los extractos de EtOAc, y mediante técnicas espectrales, se aisló el (-)-ácido hamanásico A ((-)-AHA: 7-carboxy-8-hydroxy-1(2), 12(13)-dien-bisabolenos, Figura 5.1), de potente actividad fitotóxica e isómero levorotatorio del (+)-ácido hamanásico A aislado por Hashidoko et al. (1991). El (-)AHA fue también aislado a partir de extractos acuosos de hojas frescas de *F. campestris* siguiendo el mismo protocolo.

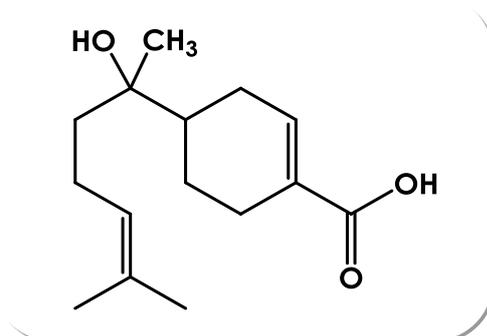
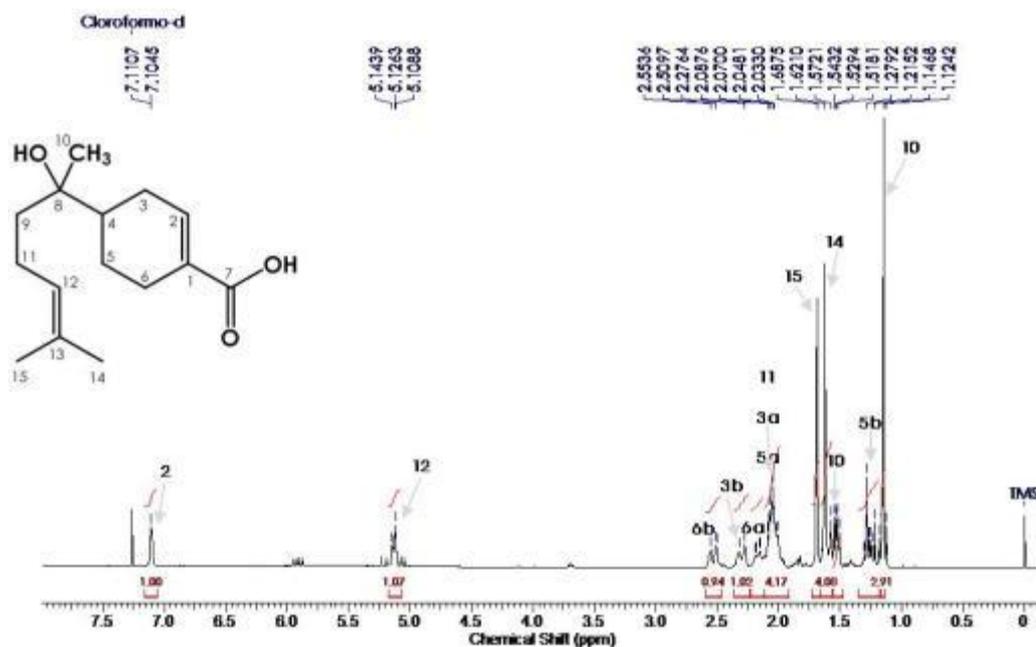


Figura 5.1 Estructura química del (-)-ácido hamanásico A.

La asignación de las señales de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C , fueron confirmadas por los espectros DEPT, COSY (correlación ^1H - ^1H), HMBC (correlación ^1H - ^{13}C de largo alcance) y HSQC (correlación ^1H - ^{13}C directa). En el espectro de ^1H -RMN (Espectro 5.1), se observan dos señales de hidrógenos vinílicos a un $\delta=7,10$ ppm y 5,13 ppm, las cuales fueron asignadas a los hidrógenos correspondientes a las posiciones 2 y 12, respectivamente (Tabla 5.1)

El hidrógeno vinílico de la posición 2, presenta un corrimiento químico a campos bajos (mayores valores de ppm), debido a que se encuentra en posición β -*cis* al carbonilo α , β insaturado del ácido carboxílico de la posición 7. A su vez, muestra un acoplamiento vinílico en *trans* con los hidrógenos del metileno de la posición 6 ($J=2,5$ Hz) (Tabla 5.1).



Espectro 5.1. Señales de ^1H -RMN del (-)-ácido hamanésico A.

δ (ppm)	Multiplicidad	Integración	J (Hz)	Asignación
1,15	singlete	3 H		10
1,24	<i>dddd</i>	1 H	12,3; 12,3; 12,5; 5,3	5 b
1,50-1,57	multiplete	2 H		9
1,62	singlete	3 H		14
1,62	señal oscurcida	1 H		4
1,68	singlete	3 H		15
2,04-2,07	multiplete	4 H		11, 3 a, 5 a
2,14-2,19	multiplete	1 H	17,6; 2,5	6 a
2,30	doblete ancho	1 H	18,8	3 b
2,53	doblete ancho	1 H	17,6	6 b
5,13	triplete ancho	1 H	1,2	12
7,10	triplete ancho	1 H	2,5	2

Tabla 5.1 Corrimiento químico (δ), multiplicidad, integración, constantes de acoplamiento (J) y asignación de los hidrógenos del (-)-ácido hamanésico A.

El hidrógeno de la posición 12, está acoplado con los hidrógenos del metileno de la posición 11 (posición *gem* sp^2 , $J=7,0$ Hz), y con los hidrógenos de los grupos metilos de las posiciones 14 y 15 ($J=1,2$ Hz), evidenciando la presencia de un fragmento 3,3-dimetil alilo (Figura 5.2).

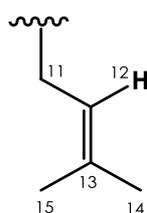


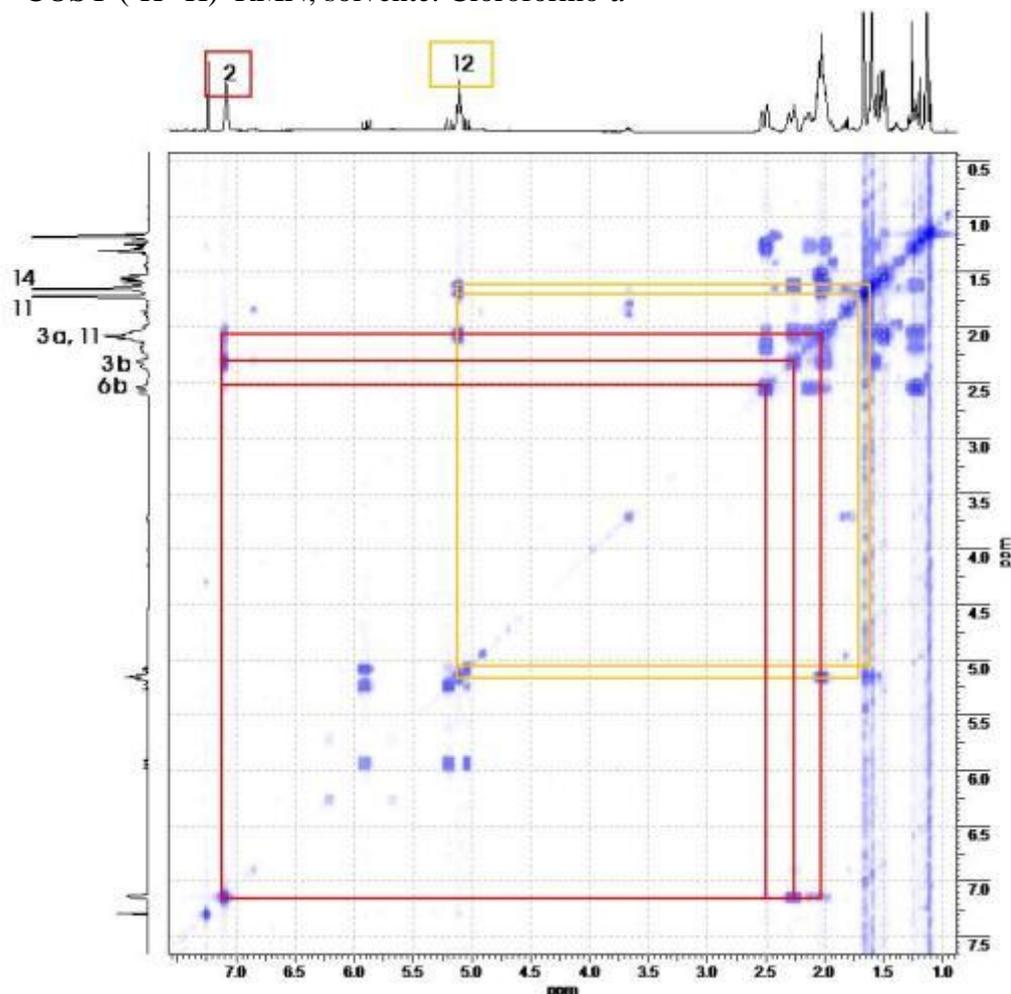
Figura 5.2 Fragmento 3,3-dimetil alilo.

Los singletes que aparecen a un $\delta=1,62$ ppm y 1,68 ppm, y que integran para 3 hidrógenos cada uno, fueron asignados a los protones de los grupos metilos de las posiciones 14 y 15 respectivamente, ya que el corrimiento químico corresponde a grupos metilos unidos a un carbono sp^2 . El singlete que aparece a $\delta=1,15$ ppm, integra para tres hidrógenos y fue asignado a los hidrógenos del grupo metilo

de la posición 10.

El hidrógeno 5 b presenta acoplamiento de tipo *vecinal* axial-axial en el anillo de ciclohexeno ($J= 12.0$ Hz) con el hidrógeno 6 a y la señal oscura que aparece a 1,62, y se acopla de manera axial-ecuatorial ($J= 5,3$ Hz) con 6 b. Asimismo, el hidrógeno de la posición 6 a muestra una constante de acoplamiento *gem* con 6 b.

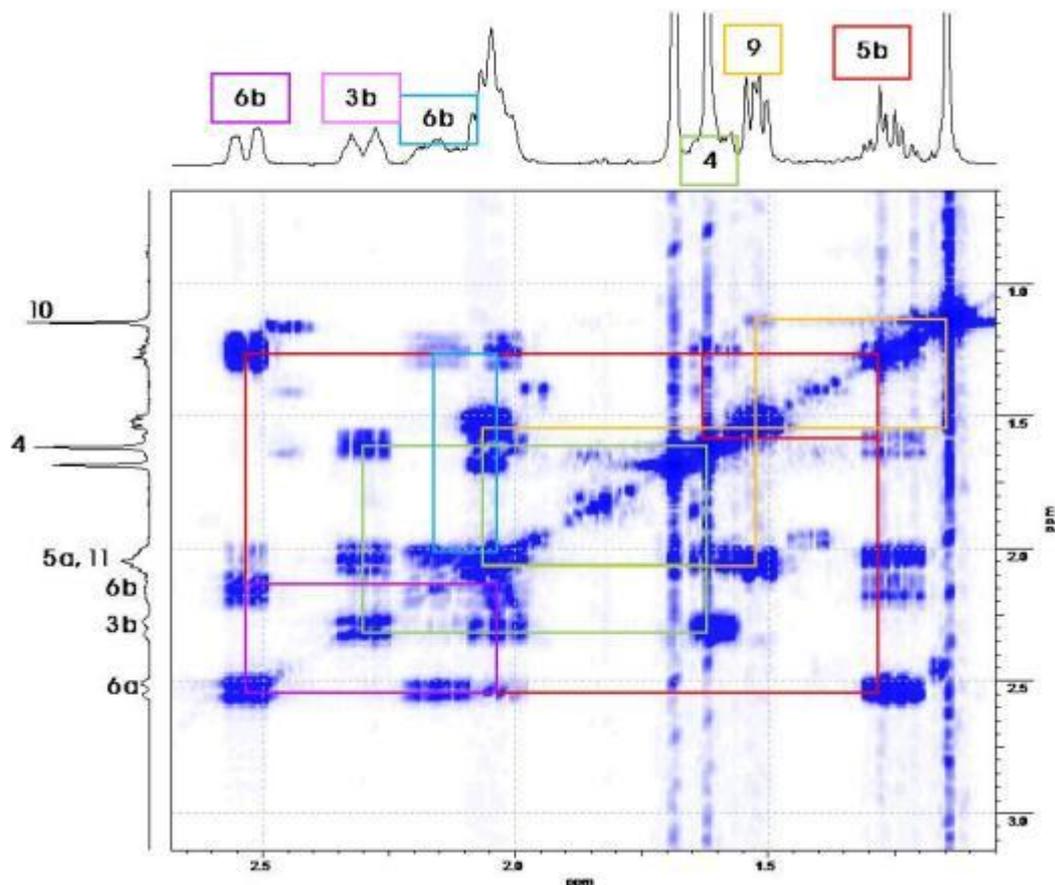
- COSY ($^1\text{H}-^1\text{H}$) RMN, solvente: Cloroformo-*d*



Espectro 5.2 Señales de COSY 1H-1H del (-)-ácido hamanésico A. Se resaltan las principales correlaciones de los hidrógenos vinílicos 2 y 12.

N° ^1H , δ (ppm)	N° ^1H acoplados
5 b (1,24)	4, 5 a, 6 a, 6 b
9 (1,50-1,57)	11, 10
14 (1,62)	12
4 (1,62)	3 b
15 (1,68)	12
5 a (2,04-2,07)	5 b
11 (2,04-2,07)	9, 12, 15
3 a (2,04-2,07)	4, 3 b, 2
3 b (2,30)	4, 3 a, 2
6 b (2,17)	5 a, 5 b, 6 a, 2
6 a (2,53)	5 a, 5 b, 6 b
12 (5,13) 	14, 11, 15
2 (7,10) 	3 a, 3 b

Tabla 5.2 Correlaciones COSY 1H-1H de hidrógenos del (-)-ácido hamanésico A.



Espectro 5.3 Señales de COSY ^1H - ^1H ampliadas del (-)-ácido hamanásico A. Se resaltan las correlaciones de los hidrógenos 5 b, 9, 4, 3 b, 6 b, 6 a.

Nº ^1H , (ppm)		Nº ^1H acoplados
5 b (1,27)	□	4, 5 a, 6 a, 6 b
9 (1,50-1,57)	□	11, 10
4 (1,62)	□	3 b, 5 a
3 b (2,30)	□	4, 3 a, 2
6 b (2,17)	□	5a-b, 6 a, 2
6 a (2,53)	□	5a-b, 6b

Tabla 5.3 Correlaciones COSY ^1H - ^1H de hidrógenos 5 b, 9, 4, 3 b, 6 a y 6 b del (-)-ácido hamanásico A.

El espectro COSY muestra los sistemas de espines acoplados entre los núcleos de hidrógeno del ácido hamanásico A. El hidrógeno de la posición 2 (Espectro y Tabla 5.2) se encuentra acoplado al hidrógeno de la posición 6 b (2,53 ppm), y a los hidrógenos de las posiciones 3 a (2,04 ppm-2,07 ppm) y 3 b (2,30 ppm), y éste último se encuentra acoplado con el hidrógeno de la posición 4 (señal oscura a 1,62 ppm, Espectro y Tabla 5.3). A su vez, el hidrógeno 6 b, se encuentra acoplado a los hidrógenos 5 a (2,04 ppm-2,07 ppm), 5 b (1,24 ppm) y 6 a (2,14 ppm- 2,19 ppm).

En el Espectro 5.3 se observa, un pico de cruce que muestra el acoplamiento del hidrógeno de la posición 5 b con la señal oscura del metino de la posición 4 (1,62 ppm). Con los picos de cruce antes mencionados, los valores de las constantes de acoplamiento y la multiplicidad del hidrógeno 5 b observadas en el experimento ^1H

(Espectro 5.1), se concluye que el hidrógeno 5 b se encuentra en posición axial en el anillo de ciclo hexeno y está acoplado al protón *gem* 5 a, y a los protones vecinales en posiciones axiales 6 a ($J= 12,3$ Hz) y 4, y al hidrógeno 6 b (2,53 ppm) en posición ecuatorial, evidenciada por el valor de la constante de acoplamiento de 5,3 Hz. De esta manera, se propuso el fragmento del anillo de ciclo hexeno, como muestra la Figura 5.3.

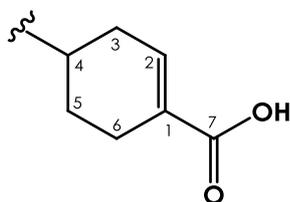


Figura 5.3 Fragmento de anillo ciclo hexeno.

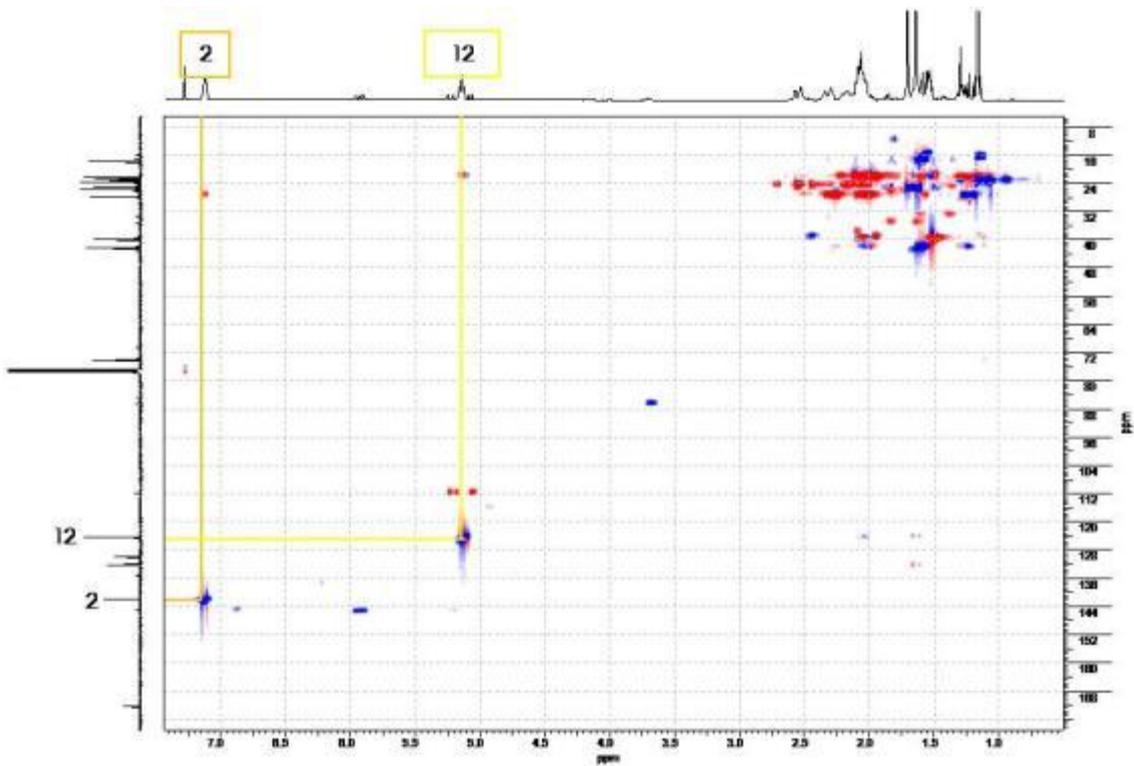
Los picos de cruces entre el hidrógeno de la posición 12, con los hidrógenos de las posiciones 11, 14 y 15 confirman el fragmento alílico propuesto de la Figura 5.1.

En el Espectro y Tabla 5.3 se muestran los picos de cruce del grupo metileno de la posición 9 (1,50 ppm-1,57 ppm), el cual se encuentra acoplado con los hidrógenos del grupo metileno de la posición 11 (2,04 ppm-2,07 ppm) y con el grupo metilo de la posición 10 que aparece a 1,15 ppm.

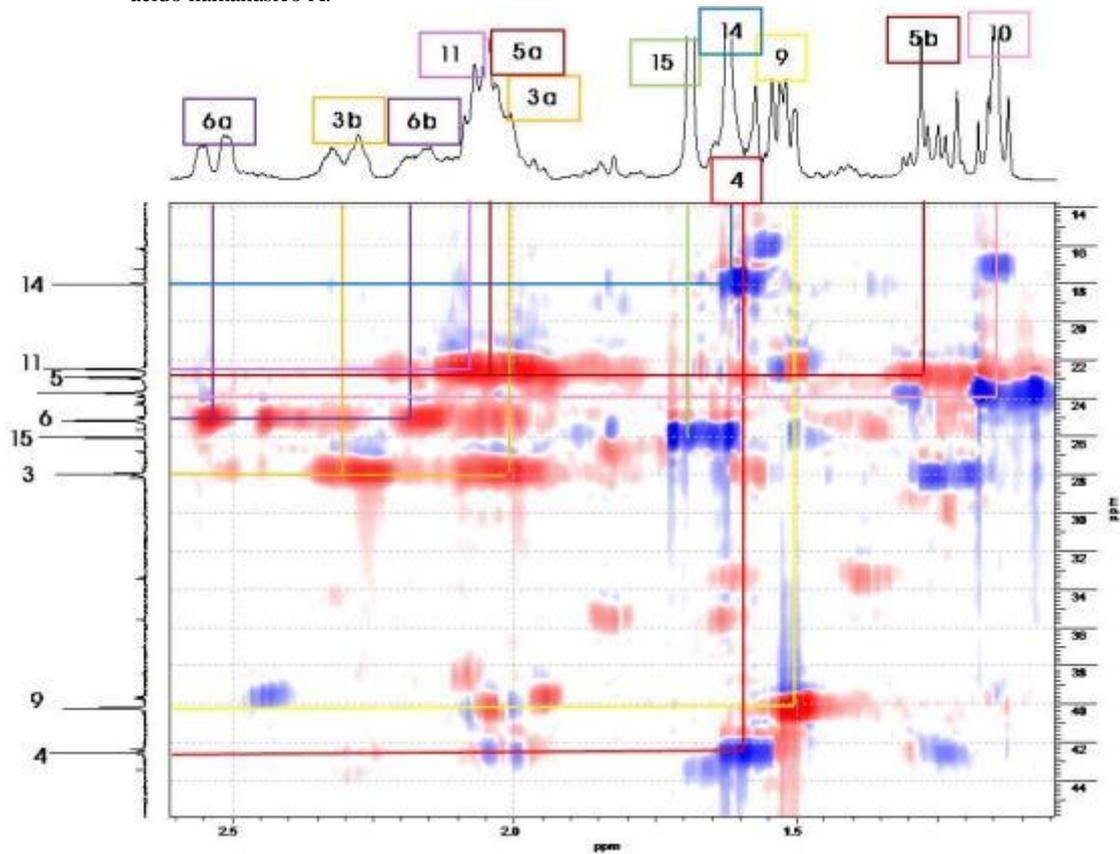
HSQC (correlación ^1H - ^{13}C unidos) y DEPT 135 RMN, solvente: Cloroformo-*d*

En el espectro HSQC (Espectro 5.4), se observan los picos de cruce correspondientes a los hidrógenos y carbonos directamente unidos en la estructura molecular. Con el experimento DEPT 135 (Espectro 5.6), fue posible realizar la asignación de carbonos de tipo metino (-CH-) y metilo (-CH₃), ya que aparecen en fase (hacia arriba), y de carbonos pertenecientes a grupos metilenos (-CH₂-) que aparecen en fase invertida (hacia abajo). El análisis de ambos experimentos (HSQC y DEPT 135) simplificó y facilitó la asignación de señales del espectro de ^{13}C . Los datos experimentales se muestran en la Tabla 5.4.

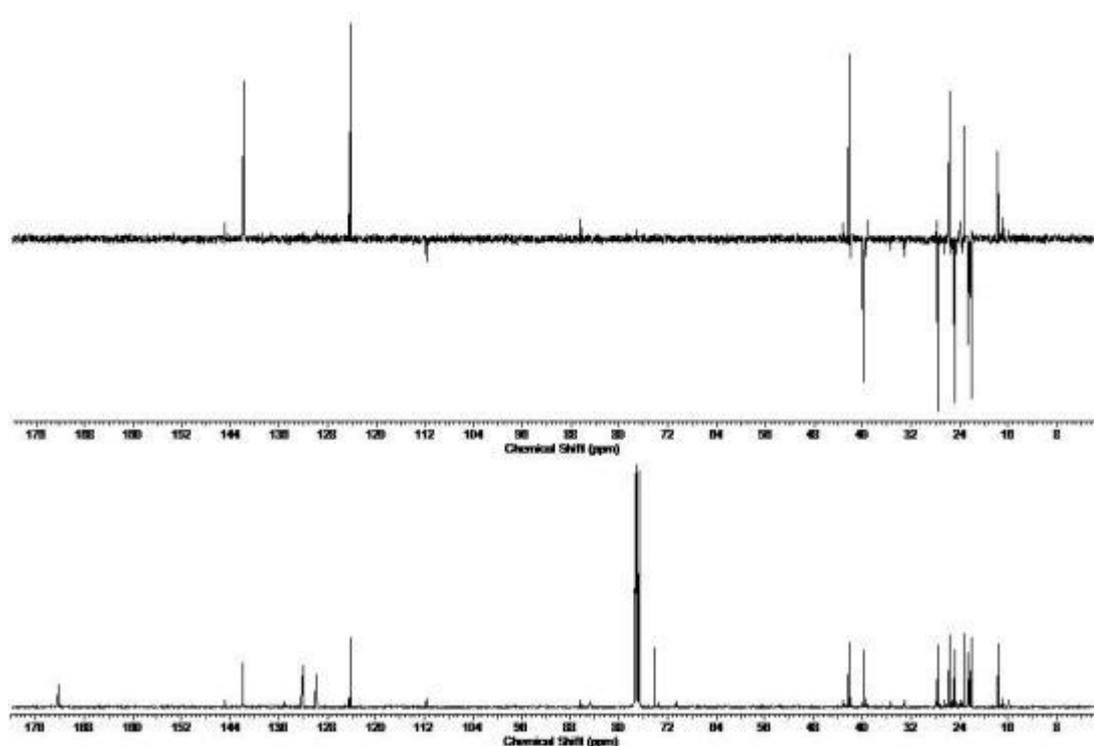
De esta manera, se asignaron 11 carbonos de la estructura química del ácido hamanásico A. Los cuatro carbonos que restan, corresponden a carbonos cuaternarios. Estas señales no aparecen en el experimento DEPT 135, y en el HSQC no presentan picos de cruce al no encontrarse unidos a hidrógenos. Su asignación se realizó analizando el espectro de ^{13}C (Espectro 5.6) y luego fueron confirmadas en el espectro HMBC (Espectro 5.7), el cual permite obtener información de los núcleos de hidrógeno acoplados a átomos de carbono a largo alcance (hasta 5 enlaces).



Espectro 5.4 Señales de HSQC ^1H - ^{13}C unidos directamente en la estructura molecular del (-)-ácido lacticó A.



Espectro 5.5 Señales de HSQC ^1H - ^{13}C ampliadas del (-)-ácido lacticó A.

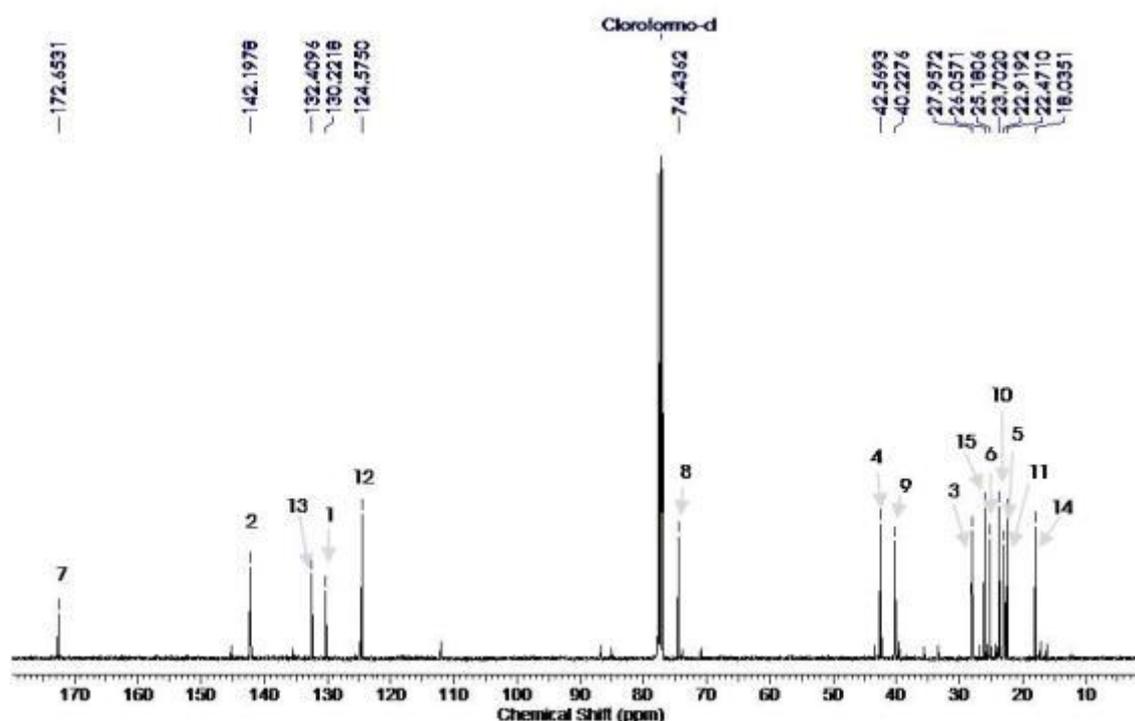


Espectro 5.6 DEPT 135 del (-)-ácido hamanásico A.

^1H , δ (ppm)	Correlación ^1H - ^{13}C	DEPT 135
10 (1,14)	10 (23,7)	CH ₃
9 (1,50-1,57)	9 (40,2)	CH ₂
4 (1,62)	4 (42,6)	CH
14 (1,62)	14 (18,0)	CH ₃
15 (1,68)	15 (26,0)	CH ₃
5 a y 5 b (2,04-2,07 y 1,27)	5 (22,9)	CH ₂
11 (2,04-2,07)	11 (22,5)	CH ₂
3 a y 3 b (2,30 y 2,04-2,07)	3 (27,9)	CH ₂
6 a y 6 b (2,53 y 2,17)	6 (25,2)	CH ₂
12 (5,12)	12 (124,6)	CH
2 (7,10)	2 (142,2)	CH

Tabla 5.4 Correlaciones HSQC ^1H - ^{13}C y DEPT 135 del (-)-ácido hamanásico A.

- ^{13}C RMN, solvente: Cloroformo-*d*



Espectro 5.7 ^{13}C del (-)-ácido hamanásico A.

δ (ppm)	Assignment N° C	δ (ppm)	Assignment N° C
18,0	14	42,6	4
22,5	11	74,4	8
22,9	5	124,6	12
23,7	10	130,2	1
25,2	6	132,4	13
26,0	15	142,2	2
27,9	3	172,6	7
40,2	9		

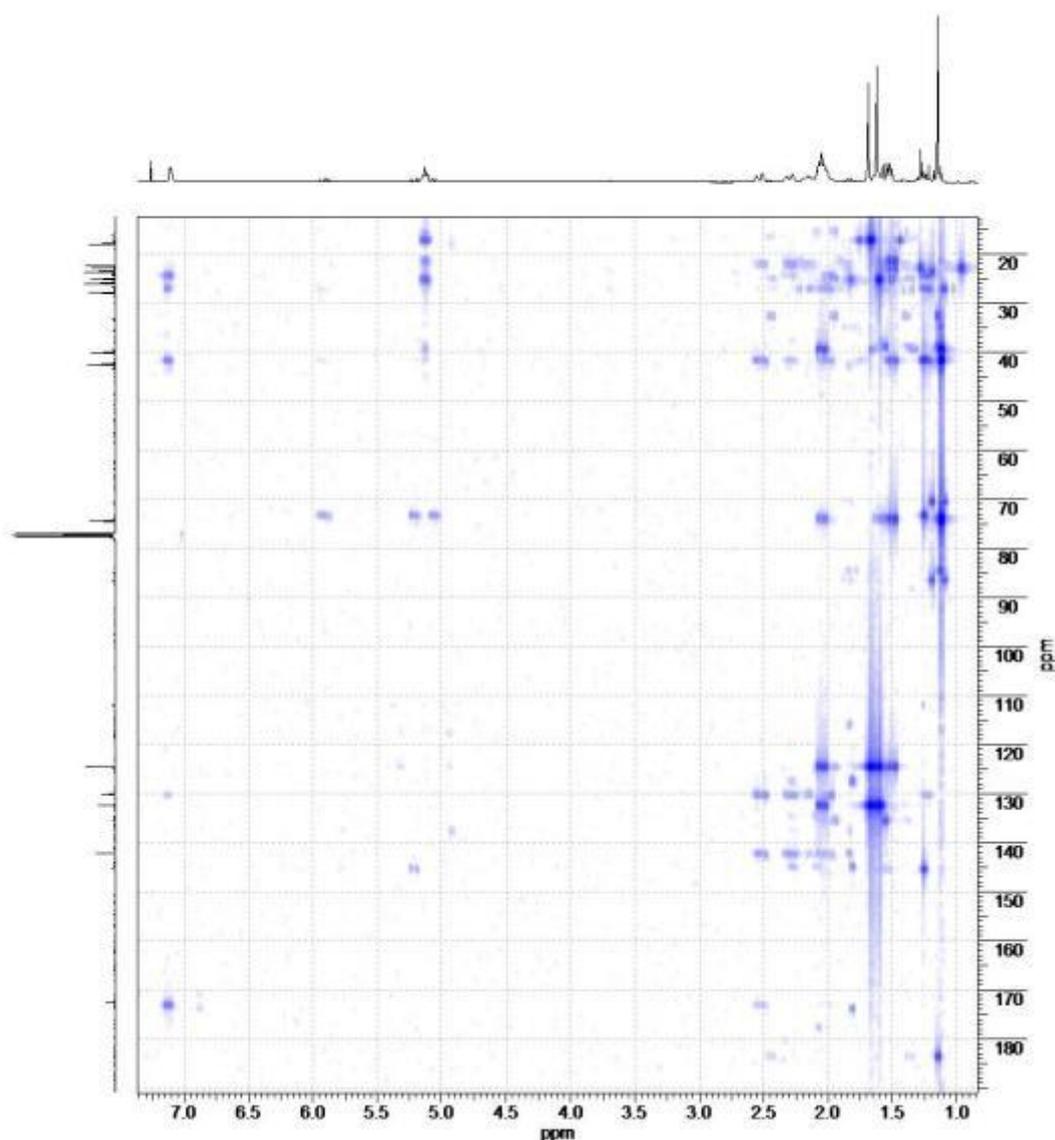
Tabla 5.5 Corrimiento químico y asignación de núcleos en la estructura molecular del (-)-ácido hamanásico A.

Luego de analizar los espectros HSQC, DEPT 135 y ^{13}C (Espectros 5.4, 5.5, 5.6 y 5.7), se asignaron las cuatro señales pertenecientes a los carbonos cuaternarios de la estructura del (-)-ácido hamanásico A.

La señal de $\delta=74,4$ ppm se asignó al carbono cuaternario de la posición 8, debido a que se encuentra unido a un grupo hidróxido. Los carbonos cuaternarios que aparecen a $\delta=130,2$ ppm y $\delta=132,4$ ppm fueron asignados a los carbonos 1 y 13 (carbonos vinílicos), respectivamente, y el carbono cuaternario con $\delta=172,6$ ppm se asignó al carbono del grupo carbonilo del ácido carboxílico de la posición 7.

Por último, se analizaron los datos del espectro HMBC, lo cual permitió obtener la conectividad estructural completa de la molécula del (-)-ácido hamanásico A.

- HMBC (^1H - ^{13}C hasta cinco enlaces), solvente: Cloroformo-*d*



Espectro 5.8 Señales de HMBC del (-)-ácido hamanásico A

N° ^1H , δ (ppm)	N° ^{13}C , Asignación
10 (1,14)	4, 9, 8
9 (1,50-1,57)	11, 10, 4, 12, 8
14 (1,62)	13,12, 15
15 (1,68)	14, 13, 12
5 a y 5 b (2,04-2,07 y 1,27)	14, 8, 2, 3, 10
11 (2,04-2,07)	9, 8, 12, 13
3 a y 3 b (2,30 y 2,04-2,07)	5, 4, 1, 2
6 a y 6 b (2,53 y 2,17)	5, 4, 1, 2, 7
12 (5,12)	14, 11, 15, 9
2 (7,10)	6, 3, 4, 1, 7

Tabla 5.6 Correlaciones HMBC del (-)-ácido hamanásico A.

En la Tabla 5.6 se muestran todas las correlaciones a largo alcance correspondientes a la estructura química del (-)-ácido hamanásico A.

Las correlaciones más relevantes que contribuyeron a unir los fragmentos propuestos anteriormente (Figuras 5.2 y 5.3), son las interacciones que presentan los hidrógenos de las posiciones 2, 10, y 12. Las mismas se presentan en la Figura 5.4.

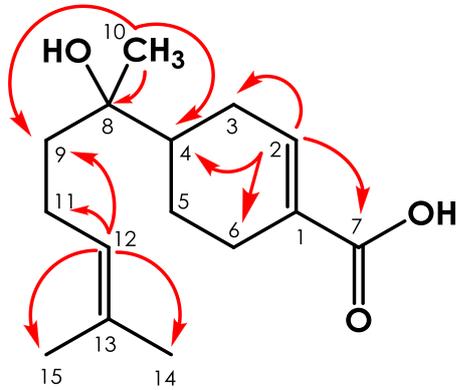
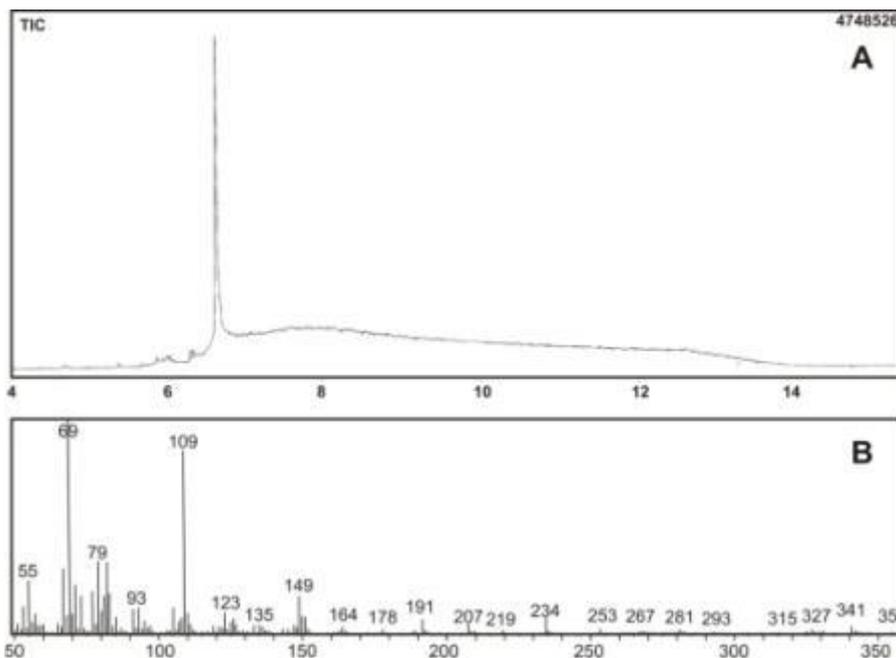


Figura 5.4 HMBC, correlaciones más relevantes del (-)-ácido hamanásico A.

Con estos datos, la cadena alílica propuesta en la Figura 5.2 se une al anillo de ciclohexeno (Figura 5.3) por el átomo de carbono cuaternario 8 ($\delta = 74,4$ ppm), lo que es coherente con la desprotección observada en los carbonos adyacentes 4 (metino, $\delta = 42,6$ ppm) y 9 (metileno, $\delta = 40,2$ ppm), los cuales aparecen desapantallados debido a la presencia del grupo hidróxido.

El análisis de los espectros ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY RMN, fueron compatibles con los datos obtenidos por Hashidoko et al. (1991), el cual describe al (+)-ácido hamanásico A, obtenido a partir de hojas de *Rosa rugosa* (Rosaceae). En el espectro del HMBC el entrecruzamiento entre los picos H-10/C-4, C-9 y C-8, H-12/C-14, C-11, C-15 y C-9, y la correlación H-2/C-6, C-3, C-4, C-1 y C-7 (Figura 5.4) coinciden con los fragmentos C, A y B, respectivamente descriptos para el (+)-ácido hamanásico A (Hashidoko et al. 1991).

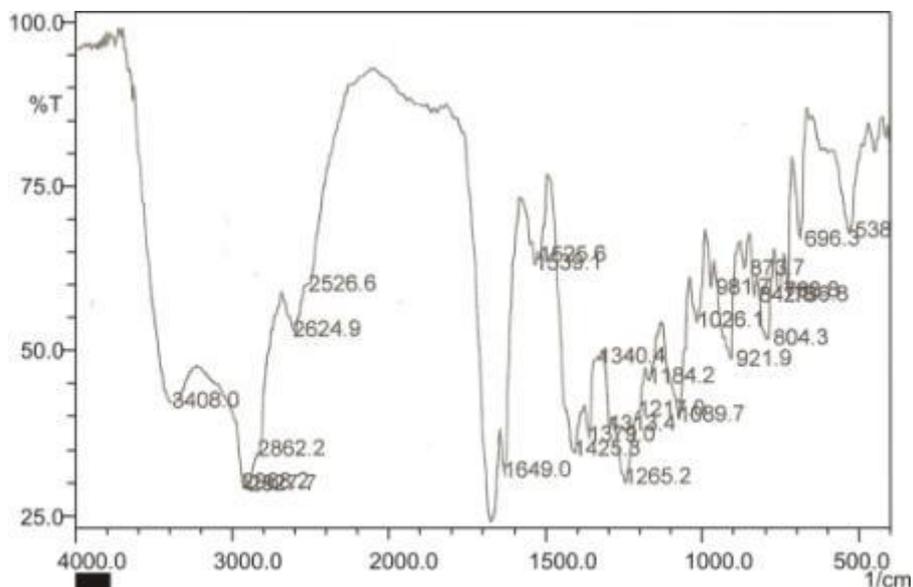
5.3.1.1.- Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa



Espectro 5.9. A: Cromatograma del (-)-ácido hamanásico A. **B:** Espectro de masas del (-)-ácido hamanásico A

El espectro de masa por impacto electrónico no muestra el ión molecular (Espectro 5.9). Los fragmentos observados poseen los siguientes valores de relación m/z , y porcentaje de abundancia relativa (%): 234 (10), 217 (2), 219 (1,5), 164 (2), 139 (3), 136 (2), 109 (80), 82 (35), 69 (100), 55 (25).

5.3.1.2.- Espectroscopía Infrarrojo (IR)



Espectro 5.10 Espectro de infrarrojo del (-)-ácido hamanásico A.

Los datos obtenidos del espectro de IR, corresponden a las bandas de estiramiento (*stretching*) y flexión (*bending*) características de los grupos funcionales presentes en la estructura molecular del (-)-ácido hamanásico A. Los mismos se detallan en la Tabla 5.7.

Grupo funcional	Nº de onda (1/cm)	Intensidad	Asignación
OH	3408.0	Fuerte	<i>Stretching</i> del OH de alcohol terciario.
OH	3300-2500	Fuerte	<i>Stretching</i> del OH del ácido carboxílico (zona solapada).
C-H	2800-3000	Media-Fuerte	<i>Stretching</i> del enlace C-H de grupos metilos y metilenos (zona solapada).
C=O	1698.0	Fuerte	<i>Stretching</i> del grupo C=O α , β insaturado del ácido carboxílico.
C=C	1649.0	Fuerte	<i>Stretching</i> del doble enlace carbono-carbono de alqueno.
C-O-H	1425.3	Media	<i>Bending</i> de los enlaces C-O-H del ácido carboxílico.
C-O	1265.2	Fuerte	<i>Stretching</i> del enlace C-OI.
OH	921.9	Media	<i>Bending</i> del grupo OH del ácido carboxílico dimerizado.

Tabla 5.7 Datos de IR de la molécula del (-)-ácido hamanásico A.

La estructura del compuesto bioactivo, presenta dos centros quirales (C-4 y C-8). Se obtuvo un valor de α experimental de - 0,436 (levorrotatorio). Así el valor de rotación óptica específica α a 25°C a una concentración de 0.70 % en acetona fue de -63.0° ($[\alpha]_D^{25}$, c 0.70, acetona).

Cabe destacar que el valor de $[\alpha]_D$ informado por Hashidoko y col. (1991) para el ácido hamanásico aislado de *Rosa Rugosa* fue de +68° (dextrógiro). El autor sugiere que el responsable de esta rotación es el carbono quiral C-4. El valor de $[\alpha]_D$ medido para el compuesto obtenido a partir de extractos acuosos de *F. campestris*, nos permite sugerir que sería un epímero o el enantiómero del compuesto aislado por Hashidoko.

A continuación se detallan los datos espectroscópicos obtenidos:

$^1\text{H-RMN}$: (400 MHz, Cloroformo-*d*), δ (ppm): 1,15 (*s*; 3H); 1,24 (*dddd*; $J=12,3$ Hz; $J=12,3$ Hz; $J=12,5$ Hz; $J=5,3$ Hz; 1H); 1,50-1,57 (*m*, 2H); 1,62 (*s*; 3H); 1,62 (señal oscura; 1H); 1,68 (*s*; 3H); 2,04-2,07 (*m*; 4H); 2,14-2,19 (*m*; $J=17,6$ Hz; $J=2,5$ Hz 1H); 2,30 (*d*; $J=18,8$ Hz; 1H); 2,53 (*d*; $J=17,6$ Hz; 1H); 5,13 (*s*; $J=7,0$ Hz, $J=1,5$ Hz, 1H); 7,10 (*t*; $J=2,5$ Hz; 1H).

$^{13}\text{C-RMN}$: (100 MHz, Cloroformo-*d*), δ (ppm): 18,0; 22,5; 22,9; 23,7; 25,2; 26,0; 27,9; 40,2; 42,6; 74,4; 124,6; 130,2; 132,4; 142,2; 172,6.

FT-IR (KBr) (cm^{-1}): 3408.0 (OH), 3300-2500, 3000-2800, 1698.0, 1649.0, 1425.3, 1265.2, 921.9.

EM (EI-70 eV): Relación masa/carga de los fragmentos (% abundancia relativa), 234 (10) [$\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$], 217 (2), 219 (1,5), 164 (2), 139 (3), 136 (2), 109 (80), 82 (35), 69 (100), 55 (25).

$[\alpha]_D^{25}$: - 63.0° (c 0,70, acetona).

5.3.2.- Actividad fitotóxica del (-)-ácido hamanásico A puro.

Las tres variables de respuestas seleccionadas para evaluar la actividad fitotóxica del compuesto aislado (germinación, crecimiento de raíz y de tallo) mostraron un patrón similar al observado utilizando los distintos extractos de tejido: el crecimiento de las raíces mostró mayor sensibilidad, seguido por el crecimiento de tallo y por último la germinación de *L. sativa*. La Figura 5.5 muestra los efectos fitotóxicos del compuesto bioactivo sobre la germinación y sobre los crecimientos de raíz y tallo de *L. sativa*. La curva dosis respuesta del (-)AHA mostró las siguientes concentraciones inhibitorias (CI) sobre la germinación (g) y el crecimiento de tallo (t) y raíz (r): $\text{CI}_{50g}=2,9$ mM, $\text{CI}_{50r}=1,5$ mM y $\text{CI}_{50t}=2,0$ mM. La morfología externa de las raíces fue anormal, observamos raíces delgadas y rectas, con escasos o nulos pelos absorbentes, a su vez en los ápices radicales se hizo muy evidente el tejido dañado (tips negros/necrosados).

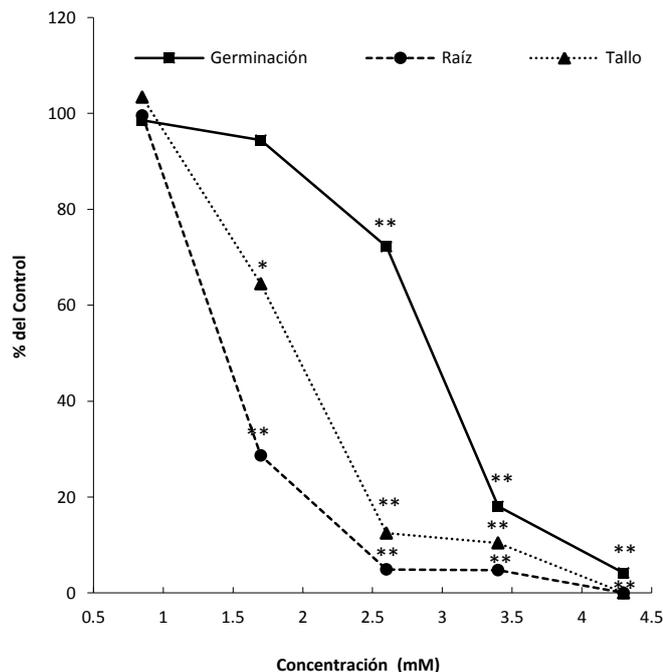


Figura 5.5: Efecto del ácido (-)-hamanásico A sobre la germinación, y el crecimiento de raíz y tallo de *L. sativa*. Los puntos representan las medias entre tres bioensayos independientes. (*), (**); diferencias significativas con respecto al control $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente.

5.3.3.- Cuantificación del (-)AHA

Mediante GC-FID, los datos obtenidos mostraron una elevada concentración de (-)AHA en hojas de *F. campestris* (del orden de 15 mg g^{-1}), al menos 10 veces mayor que la encontrada en hojas de *F. oolepis*. Un perfil similar se observó entre las flores de *F. campestris* y *F. oolepis*, mientras que en las raíces la concentración de (-)AHA fue mucho menor que en los otros órganos y similar para ambas especies (Tabla 5.8). Los mismos resultados se encontraron utilizando la técnica de TLC-2D descrita (Figura 5.6). Estos resultados estarían en concordancia con lo observado en los bioensayos, donde los extractos acuosos de *F. campestris* presentaron mayores efectos inhibitorios que los extractos de *F. oolepis* (ver capítulo anterior). La Tabla 5.9 muestra la concentración significativamente mayor de (-)AHA hallada en extractos acuosos de hojas frescas de *F. campestris* al 3 %, comparada con la encontrada en extractos acuosos de hojas secas.

Cuando comparamos la producción de (-)AHA entre las diferentes poblaciones de *F. campestris* y *F. oolepis*, no sólo se mantuvieron las diferencias entre especies, sino que a su vez se hallaron diferencias significativas por área muestreada (Tabla 5.8).

En ninguno de los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación tanto de *F. campestris* como de *F. oolepis* se pudo identificar la presencia de (-)AHA (Figura 5.7).

	(-)AHA (mg g ⁻¹ peso seco)			
	<i>Flourensia campestris</i>		<i>Flourensia oolepis</i>	
	RÍO PINTOS	EL DRAGÓN	LOS TERRONES	EL CAJÓN
Hoja	16,0 ± 0,7*	13,0 ± 0,99*	0,43 ± 0,04*	1,37 ± 0,06*
Inflorescencia	17,0 ± 0,6	17 ± 0,6	1,25 ± 0,005*	1,10 ± 0,04*
Raíz	0,58 ± 0,01*	0,9 ± 0,1 *	0,52 ± 0,01*	0,28 ± 0,00001*

Tabla 5.8. Concentración de (-)AHA en diferentes órganos y poblaciones de *F. campestris* y *F. oolepis*. Medias ± ES, a partir de dos experimentos independientes con tres ensayos para cada determinación (n = 6). Los asteriscos representan diferencias significativas entre las hojas secas y frescas (p <0,05).

Extractos acuosos al 3%	(-)AHA	
	mg g ⁻¹ peso seco	mM
Hojas frescas	7,8 ± 0,4	1,0 ± 0,1
Hojas secas	4,9 ± 0,3*	0,64 ± 0,06*

Tabla 5.9. Concentración de (-)AHA en extractos acuosos de hojas de *F. campestris*. Medias ± ES, a partir de dos experimentos independientes con tres ensayos para cada determinación (n = 6). Los asteriscos representan diferencias significativas entre las hojas secas y frescas (p <0,05).

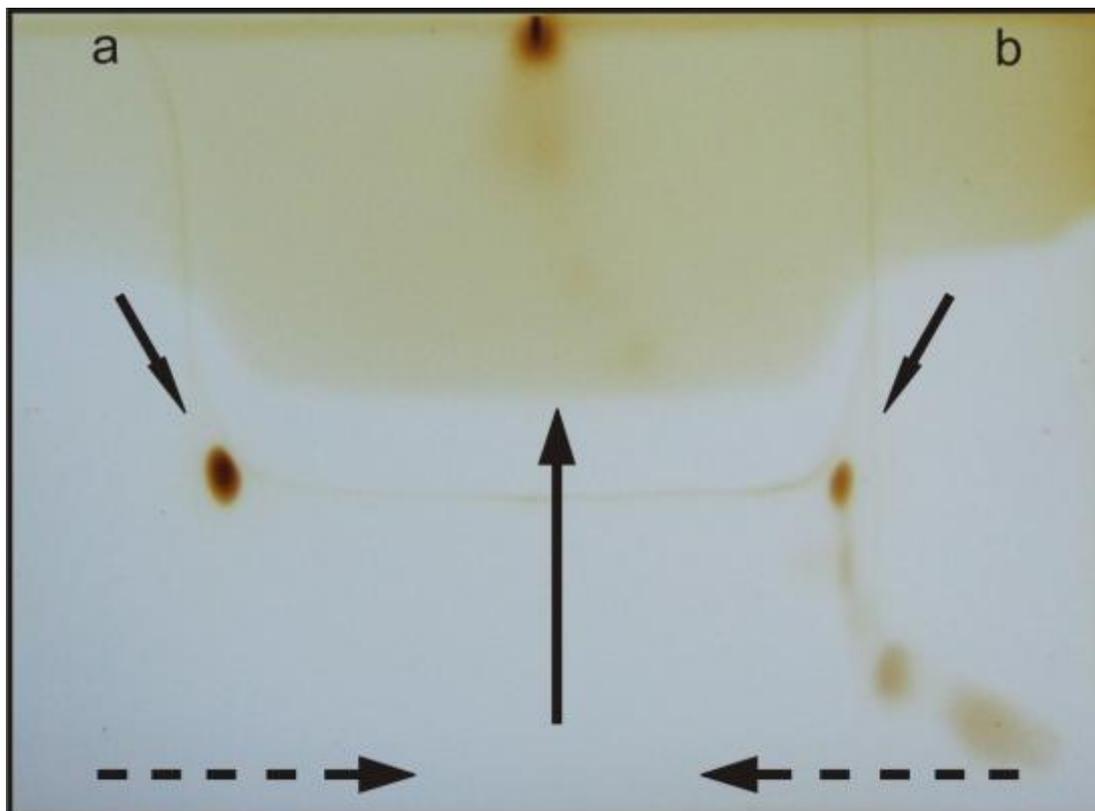


Figura 5.6. TLC-2D. Se observa la identificación y semi-cuantificación de (-)-ácido hamanésico A (a) y una muestra de la fase apolar del extracto acuoso de hojas de *F. campestris* particionado con EtOAc (b), teñido con vapores de I₂. Flecha cortada y flecha completa indican el recorrido en primera y segunda dimensión, respectivamente. El compuesto bioactivo se indica con las flechas diagonales.

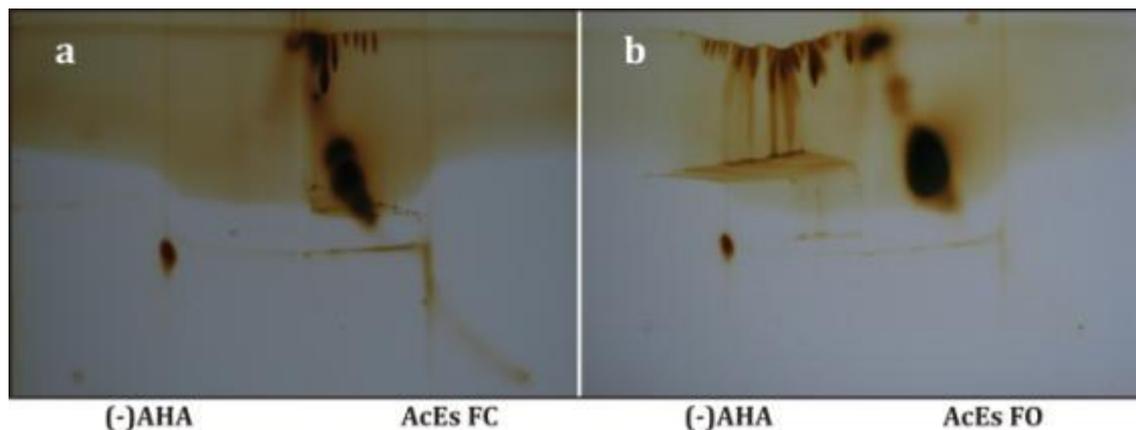


Figura 5.7. TLC-2D de (-)AHA y aceites esenciales (1:200) de *F. campestris* (a) y *F. oolepis* (b). En ninguno de los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación se pudo identificar la presencia de (-)AHA.

5.3.4.- Determinación de los compuestos volátiles.

Mediante las técnicas descritas, en *F. campestris* se pudo identificar un total de 23 compuestos, 4 monoterpenos y 19 sesquiterpenos, representando el 95 % del total de volátiles detectados (Tabla 5.10). Se observó una marcada diferencia estacional en la composición de volátiles. La fracción de monoterpenos se incrementó de 0,69 % en primavera a 13,08 % en verano, mientras que la fracción de sesquiterpenos disminuyó de 96,0 % en primavera a 79,9 % en verano, reflejando una mayor producción de sesquiterpenos durante la primavera. Los monoterpenos obtenidos durante la estación de verano, presentaron cantidades similares de monoterpenos hidrocarbonados y oxigenados (5,85 % y 7,23 %, respectivamente).

En primavera los sesquiterpenos se caracterizaron por altas concentraciones de sesquiterpenos hidrocarbonados (71 %), siendo los más representativos el biciclogermacreno (36,7 %), beta cariofileno (15,3 %) y el bicicloelemeno (18,0 %), mientras que los sesquiterpenos oxigenados representan solo el 25 %, siendo el globulol (19,6 %) y el espatulenol (4,1 %) los más representativos de este grupo de compuestos. En la estación verano el patrón fue inverso, se observó una disminución de hidrocarburos sesquiterpénicos (25 %), representados por beta-cariofileno (6,02 %) y biciclogermacreno (5,58 %) y un incremento de los sesquiterpenos oxigenados (54,9 %), siendo los representantes más importantes de este grupo de compuestos el espatulenol (32,2 %) y el óxido de cariofileno (13,4%).

Mediante la misma metodología, en *F. oolepis* se identificaron 16 compuestos (3 monoterpenos y 13 sesquiterpenos, Tabla 5.10) aproximadamente el 95% del total de los aceites esenciales.

Se observó, al igual que en *F. campestris*, una marcada diferencia estacional en la composición de volátiles. La fracción de monoterpenos fue de 3,9 % en primavera y 5,42 % en verano, mientras que la fracción de sesquiterpenos disminuyó de 87,6 % en primavera a 84,6 % en verano. La fracción monoterpénica sufrió una variación en la composición de los compuestos de una estación a otra. Durante la primavera se observaron sólo monoterpenos hidrocarbonados (alfa terpinoleno 1,51 % y alfa pienenol 2,47 %), mientras que en verano hallamos cantidades similares de monoterpenos hidrocarbonados y oxigenados (alfa pienenol 3,62 % y 3,68-ácido nonatrienoico 1,8 %).

En primavera los sesquiterpenos se caracterizaron por altas concentraciones de sesquiterpenos hidrocarbonados (69,11 %), siendo los más representativos el beta selineno naftaleno (15,12 %), biciclogermacreno (23,66 %), beta cariofileno (17,22 %) y el bicicloelemeno (3,94 %), mientras que los sesquiterpenos oxigenados representaron sólo el 18,49 %, siendo el espatulenol (12 %) y el óxido de cariofileno (6,50 %) los más

representativos de este grupo de compuestos. En verano se observó una disminución de hidrocarburos sesquiterpénicos (67,76 %), representados por beta selineno naftaleno (22,14 %), biciclogermacreno (22,45 %), beta cariofileno (13,51 %) y el bicicloelemeno (3,75 %), mientras que la fracción de sesquiterpenos oxigenados desaparece.

Como se muestra en la misma tabla, algunos compuestos en alta concentración fueron específicos de especie, como el globulol en *F. campestris* y el beta selineno en *F. oolepis*.

Compuesto	<i>Flourensia campestris</i>		<i>Flourensia oolepis</i>	
	Primavera (%)	Verano (%)	Primavera (%)	Verano (%)
α -Terpinolene	0,00	2,84	1,51	0
Isoterpinolene	0,00	3,39	0,00	0,00
α -Pinene	0,69	5,32	2,47	3,62
β -Pinene	0,00	0,53	0,00	0,00
Bicycloelemene	10,22	0,68	3,94	3,75
α -Copaene	0,73	0,00	0,00	0,00
β -Caryophyllene	15,30	6,02	17,22	13,51
Alloaromadendrene	0,71	0,00	0,00	0,00
α -Humulene	0,89	0,61	0,88	0,00
β -Selinene	0,00	0,59	0,00	0,00
Aromadendrene	1,26	0,00	1,47	0,00
Germacrene	0,00	3,60	0,00	0,00
Bicyclogermacrene	36,69	5,58	23,69	22,45
α -Amorphene	1,25	1,96	1,87	0
δ -Cadinene	1,86	1,57	1,43	1,99
α -Agarofuran	0,00	1,60	0,00	0,00
Spathulenol	4,11	32,20	11,9	11,34
Caryophyllene oxide	1,34	13,40	6,50	5,50
β -Maalinene	0,00	1,32	0,00	0,00
Bicyclo (4,4,0)	2,12	3,16	2,40	2,49
β -Eudesmol	0,00	4,30	0,00	0,00
α -Cadinol	0,00	3,27	0,00	0,00
Globulol	19,56	0,00	0,00	0,00
β -Elemene	0,00	0,00	0,00	0,00
Bycyclo(3,1,1) Hept-2-en6-spiro	0,00	0,00	1,09	1,43
β -Selinene Naphthalene	0,00	0,00	15,12	22,14
3,6,8-Nonatrienoic acid	0,00	0,00	0	1,80
Monoterpenos hidrocarbonados	0,6	5,85	3,97	3,62
Monoterpenos oxigenados	0	7,23	0	1,80
Total monoterpenos	0,69	13,08	3,97	5,42
Sesquiterpenos hidrocarbonados	71,03	25,00	69,11	67,76
Sesquiterpenos oxigenados	25,00	54,90	18,49	16,84
Total sesquiterpenos	96,03	79,90	87,60	84,6

Tabla 5.10. Composición de volátiles de hojas secas de *F. campestris* y *F. oolepis* recolectadas en diferentes estaciones. Los compuestos son listados en orden de elusión. Todos los compuestos fueron identificados por GC (comparación con el índice de retención bibliográfico) y MS (identificación en base a la comparación de espectros de masa). Los nombres de los compuestos se hallan en inglés para facilitar su identificación.

5.4.- DISCUSIÓN

A través de un fraccionamiento cromatográfico bio-guiado y por medio de espectroscopía y polarimetría se aisló e identificó un compuesto derivado de la ruta del mevalonato, un sesquiterpeno levógiro ($[\alpha]_D = -63,0^\circ$) perteneciente a la familia de los bisabolenos, el (-)-ácido hamanásico A o 7-carboxy-8-hydroxy-1(2),12(13)-dien-bisaboleno ((-)-AHA), como el principio activo responsable del efecto herbicida hallado en los extractos acuosos de hojas de *F. campestris* sobre *L. sativa*. Los espectros ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY NMR (en CDCl_3) fueron compatibles con los datos obtenidos por Hashidoko et al. (1991), el cual describe el isómero dextrógiro ((+) AHA) en las hojas de *Rosa rugosa*. Uriburu (2002) en su tesis doctoral (datos no publicados) describe al (-)AHA en *Flourensia fiebrigii*, sin embargo el compuesto mostró una rotación $[\alpha]_D = -94,4^\circ$, significativamente diferente del valor hallado en nuestro compuesto ($-63,0^\circ$). Es por ello que nuestros resultados son los primeros en reportar la presencia del (-)AHA y su actividad fitotóxica (Silva et al. 2012). Aunque en mucha menor concentración, el (-)AHA fue también encontrado en *F. oolepis* (Tabla 5.10), indicando una posible función quimiotaxonómica de este compuesto en el género *Flourensia*. Cabe señalar que hasta el presente no se ha detectado la presencia del biocompuesto en otras especies de Asteraceae (resultados no mostrados), lo que ratificaría el postulado anterior y dá cuentas sobre su limitada distribución en la naturaleza, revalorizando el potencial de las especies autóctonas.

Hashidoko et al. (1991) encontró que tanto el (+)AHA como su éster (+)-bisaborosaol A (grupo metoxi en C-7) son los componentes mayoritarios de las secreciones glandulares de las hojas de *R. rugosa*. En contraste, y utilizando las mismas metodologías (TLC) descrita por Hashidoko et al. (1991), no se halló el éster en los extractos acuosos de *F. campestris* (resultados no mostrados). Esta ausencia del éster nos sugiere diferencias biosintéticas entre (-)AHA y (+)AHA. Además, el (-)AHA es uno de los componentes principales en los extractos acuosos tanto de hojas frescas como secas, y también en los tejidos de los diferentes órganos de *F. campestris* (Tabla 5.10). A pesar de que no se conocen totalmente los mecanismos de acción y los “targets” moleculares de la mayoría de las fitotoxinas, si las acciones biológicas de los metabolitos secundarios son mediadas por su unión a receptores específicos (Mata et al. 2003, Weston y Inderjit 2007) se podría especular que el (+)AHA, debido a su diferente conformación espacial, carecería de actividad fitotóxica. La importancia de la estereoquímica sobre la actividad fitotóxica ha sido previamente demostrada. Reynolds (1987) observó que el monoterprenoide (+)-carvona provocó el 50 % de reducción en la germinación de lechuga a 0.052 mM, mientras que una concentración de 0.38 mM fue necesaria para su isómero (-)-carvona para producir el mismo efecto. En las raíces de exudados de *Centaurea maculosa*, Bais et al. (2003) encontraron que la planta produce una mezcla racémica de catequinas, ((±)-catequina), pero solo la (-)-catequina mostró fitotoxicidad, inhibiendo la germinación y el crecimiento de *Festuca idahoensis*, *Koeleria micrantha* y *Arabidopsis thaliana*. En contraste con ello, las formas isoméricas del ácido hamanásico A ((±)AHA) son producidas por diferentes especies (*F. campestris* y *R. rugosa*). La evaluación de la fitotoxicidad del (+)AHA se hace necesaria con el fin de evaluar en qué medida las diferencias configuracionales se hallan involucradas en sus actividades biológicas.

Originado a partir de la vía citosólica del mevalonato (Adam y Zapp 1998, Aharoni et al. 2006), el (-)AHA pertenece al grupo de los (-)- α -bisabololes, conteniendo oxígeno en C-7 y C-8. Bisabolenos similares han sido aislados de pino y hongos (Hamasaki et al. 1975) y de la familia Compositae (Jaensch et al. 1989, Zdero y Bohlmann 1989).

El hecho de que (-)AHA pudiera ser aislado de extractos acuosos de hojas tanto secas como frescas de *F. campestris* confirma que el compuesto bioactivo no es el resultado de descomposición o degradación enzimática durante el secado de las hojas. Este hecho sugiere un rol biogénicamente determinado que está operando durante y después del ciclo de vida de las hojas. La concentración de (-)AHA hallada en hojas secas de *F. campestris* mediante GC-FID fue realmente alta (16 mg g⁻¹ (68 μmol g⁻¹, Tabla 5.10)), representando el 1,6 % de la biomasa foliar total. Un contenido similar (1 %) del conocido compuesto fitotóxico l-DOPA fue detectado en *Mucuna pruriens* (Fujii y Hiradate 2005). Estas concentraciones son excepcionalmente altas cuando se comparan con aquellas generalmente encontradas para la mayoría de los metabolitos secundarios con actividad fitotóxica, cuyas concentraciones se hallan en el orden de los μg o ng por g de tejido (Hirai et al. 2000, Kato-Noguchi 2003a, 2003b).

La presencia del (-)AHA fue también investigada en el tejido seco de inflorescencias y raíces de *F. campestris* y *F. oolepis* (Tabla 5.10). Los resultados mostraron que el biocompuesto se halla presente en todos los órganos, con concentraciones similares en hojas e inflorescencias (al menos 10 veces más en *F. campestris* que en *F. oolepis*) y mucho menos en raíces. Este perfil entre órganos coincide con la distribución de metabolitos secundarios citados en otras especies (Ferreira et al. 1995). Los resultados a partir de estudios histológicos muestran que prácticamente todas las estructuras florales en el capítulo presentan una alta densidad de tricomas glandulares, lo que podría en parte explicar los altos niveles de (-)AHA encontrados en las inflorescencias. El hecho de que el compuesto se halle presente en todos los órganos de la planta indicaría que se produce en forma constitutiva como un importante mecanismo de defensa, probablemente con diferentes funciones y mecanismos de acción. Cuando comparamos los contenidos de (-)AHA entre las diferentes poblaciones de *F. campestris* y *F. oolepis*, no solo se mantuvieron las diferencias entre especies, sino que a su vez se hallaron diferencias significativas por área muestreada, lo que podría deberse a diferentes grados de lixiviación por las precipitaciones o estímulos involucrados con factores de stress abióticos, como los encontrados en estas regiones (altas radiaciones, escasas precipitaciones, entre otras).

Una alta concentración de (-)AHA fue también encontrada en los extractos acuosos de hojas de *F. campestris* al 3 % (Tabla 5.10), con un mayor contenido en hojas frescas comparado con hojas secas (1 mM y 0,64 mM, respectivamente). Esto fue correlacionado con los depósitos del compuesto bioactivo en ambos tejidos y revelado también por TLC-2D. Aunque la masa total de compuestos solubles en EtOAc obtenidos de extractos acuosos de hojas frescas mostró una pérdida del 50 % debido al secado, una cantidad aproximada al 63 % de (-)AHA se encontró en los extractos acuosos a partir de hojas secas, sugiriendo una óptima preservación durante el secado foliar. Los resultados mostraron que cerca del 30 % de los depósitos presentes en las hojas de *F. campestris* pudieron ser recuperados en los extractos acuosos, lo que indicaría que el lixiviado por agua de lluvia sería la vía principal de liberación del compuesto bioactivo al ambiente. Desde los primeros informes de Lee y Monsi (1963) que documentaron cómo el lixiviado por la lluvia de las hojas del pino rojo (*Pinus densiflora*) eran perjudiciales para los cultivos creciendo cerca de estas especies, ha habido un creciente interés en el estudio y cuantificación de los compuestos presentes en el "leaching" (lavado por agua de lluvia o humedad) de las plantas (Macías et al. 1997, Chou 1999, Kohli et al. 2001). Este tipo de liberación de compuestos fitotóxicos puede ser de particular importancia en regiones áridas y semiáridas, en las cuales la germinación se halla limitada por la temperatura y precipitaciones estacionales. En el caso de *F. campestris*, la lixiviación de (-)AHA a partir de las hojas durante las lluvias

podría ejercer un importante efecto inhibitorio sobre la germinación del banco de semillas, reduciendo así la potencial competencia en estos medios limitados de recursos.

Estudios realizados al presente (no mostrados) proveerían evidencias consistentes de que el (-)AHA es secretado por los tricomas glandulares: i) extracciones rápidas (10 a 15 s) de hojas frescas de *F. campestris* en EtOAc o agua revelaron una alta concentración del compuesto bioactivo, representando el 20-30 % del total de metabolitos secundarios acumulados en superficie; ii) los órganos con los mayores contenidos del compuesto presentan alta densidad de tricomas glandulares. Además, el isómero (+)AHA fue hallado en alta concentración en la fracción aislada de tricomas glandulares de hojas de *R. rugosa* (Hashidoko y Urashima 1995). Existe un creciente consenso acerca de que los compuestos secundarios que se acumulan por fuera de la cutícula en la superficie de las plantas (terpenoides, fenilpropanoides, etc.) son casi exclusivamente producidos por tricomas secretantes glandulares (Urzúa 2004, Wagner et al. 2004). En nuestro caso este hecho permanece todavía bajo estudio.

Los derivados bisabolanoideos han demostrado poseer un amplio rango de bioactividades: antialimentaria (Matsui et al. 2010), antiinflamatoria, bactericida y antimicótica (Harbourne et al. 1999) y antifúngica, bactericida y citotóxica (Mikhova et al. 2004). Una actividad fitotóxica para esta clase de compuestos fue observada por Macías et al. (1998), utilizando un extracto de *Helianthus annuus* sobre monocotiledóneas (*Allium cepa*) y dicotiledóneas (*Lactuca sativa* y *Lepidium sativum*). Alarcón et al. (2007) encontró también efectos fitotóxicos de dos sesquiterpenos del tipo bisaboleno aislados de *Lagascea mollis* (Asteraceae) sobre la conocida maleza *Sorghum halepense*. De acuerdo a los resultados citados y a la distribución general del (-)AHA encontrada en *F. campestris*, se podría especular que el compuesto bioactivo poseería efectos alelopáticos sobre la vegetación vecina mediados por lixiviación, manifestando incluso un mayor espectro de actividades biológicas en diferentes partes de la planta durante los diferentes estadios de desarrollo. Así, el grado de impacto o la significancia ecológica del (-)AHA deberá ser elucidada.

La actividad fitotóxica específica de metabolitos secundarios utilizando semillas de *L. sativa* en bioensayos ha sido informada en un amplio rango de concentraciones, desde nM a mM ((nM) Macías et al. 1998; (µM) Goto et al. 2001; Kato-Noguchi 2003a; (mM) Hirai et al. 2000, Sánchez-Moreiras et al. 2008). En nuestros bioensayos se encontró que la actividad específica (CI₅₀) del compuesto corresponde al rango mM (por debajo de 3 mM, Fig. 5.8). La CI₅₀ del 2.4-D sobre *L. sativa*, el herbicida sintético para hoja ancha más utilizado en el mundo, también cae dentro de este rango mM, específicamente 0,86 mM (Palacios et al. 2010). Sin embargo, algunos autores han postulado que si un compuesto es activo *in vitro* en un rango mM, sería poco probable que actúe como una fitotoxina en la naturaleza (e.g., Duke y Dayan 2006). Aunque existe en la bibliografía consultada un cierto grado de controversia en relación al nivel de concentración y la actividad de los fitocompuestos en ambientes naturales, es importante notar que, habida cuenta de la alta concentración de (-)AHA en hoja (ca. 1,6 %), y la facilidad con la que es extraído con agua, el biocompuesto aislado sería sin dudas un potente aleloquímico en *F. campestris*, hechos incluso en consonancia con hallazgos citados con aleloquímicos de otras especies (Hirai et al. 2000; Kato-Noguchi 2003a).

Los tres parámetros de respuesta seleccionados para evaluar la actividad alelopática (germinación de semillas y crecimiento de raíz y tallo) exhibieron un patrón general de respuesta similar en los bioensayos. El crecimiento de raíz fue la variable más sensible, seguida por el crecimiento del tallo y por último la germinación. Se observó una drástica inhibición del crecimiento de raíz (70 %) y tallo (50 %) con todos los medios

bioensayados (extractos acuosos, extractos de EtOAc y (-)AHA puro) a concentraciones que no mostraron efectos inhibitorios sobre la germinación de las semillas. Cuando se comparó la actividad biológica del compuesto puro con la ejercida por el mismo en el extracto de EtOAc (ver capítulo anterior) en función de su concentración, los resultados sugieren que el (-)AHA sería el único y principal compuesto responsable de los efectos fitotóxicos. Estos resultados concuerdan con lo observado en el fraccionamiento bio- guiado donde no se detectó otro compuesto con actividad fitotóxica.

Si bien la respuesta de cada uno de los parámetros fue similar en todos los bioensayos, el efecto fitotóxico fue tres veces mayor en los ensayos realizados con los extractos acuosos.

Aunque la tendencia en la respuesta a cada parámetro fue similar entre los medios evaluados, la fitotoxicidad detectada en los extractos acuosos fue 3 veces mayor que la observada en los extractos de EtOAc o con el compuesto puro. La concentración de (-)AHA calculada en los extractos acuosos que mostraron fitotoxicidad fue del orden de 1mM, mientras que en su estado puro fue cercana a 3 mM. Esta diferencia no se debería a la capacidad de extracción del EtOAc (rendimiento 95 %, datos no mostrados) sino a una mayor fitotoxicidad de los extractos acuosos, lo que podría ser explicada por un efecto sinérgico con compuestos polares y/o a la acción de detergentes naturales que podrían incrementar la solubilidad del biocompuesto y así su bioactividad. A partir de que (-)AHA es prácticamente insoluble en agua (ca. 0.1 g l^{-1}), se esperaría encontrar un incremento de su actividad específica, mediada por interacciones metabolito-metabolito y/o emulsificantes naturales (Weidenhamer et al. 1993). Sin embargo, la presencia de otros compuestos polares bioactivos no puede ser descartada. En este sentido, Kato-Noguchi (2001) encontró que la fracción soluble en agua de *Melissa officinalis* mostró la mayor actividad biológica comparada con otros medios de extracción. La actividad específica de (-)AHA en diferentes soluciones buffer o emulsificantes, y en sustrato suelo, merecen una mayor profundización con el objetivo de explorar su potencial como herbicida natural. En el mismo sentido, la determinación de otros compuestos (más polares) en los extractos acuosos de *F. campestris*, de conocido o potencial efecto aleloquímico, deberá también ser investigado.

Es de importancia hacer notar que se observó una alteración en la morfología de las raíces de las semillas germinadas con todos los medios bioensayados comparados con los controles con agua. Raíces alargadas o espiraladas, con pocos o ningunos pelos fueron rasgos característicos. Cuando se incubaron con el compuesto puro, las semillas que germinaron mostraron las puntas amarronadas y con necrosis a mayores concentraciones. Estas anomalías y otras similares en el crecimiento y desarrollo de las raíces han sido observadas en ensayos con aleloquímicos sobre otras especies (Gniazdowska y Bogatek 2005, Lotina-Hennsen et al. 2006). El tipo de cambio morfológico puede brindar información relacionada a posibles targets moleculares y mecanismos de acción. Nuevos experimentos diseñados para este propósito están siendo puestos en marcha en nuestro laboratorio.

Al presente, se ha encontrado sólo un informe en donde la actividad fitotóxica de *F. campestris* ha sido evaluada. Palacios et al. (2010) mostraron que extractos etanólicos de hojas de *F. campestris* a 10 mg ml^{-1} no tuvieron efectos sobre la germinación de *Avena sativa* y *Raphanus sativus*. Interesantemente, nosotros encontramos un potente efecto inhibitorio de la germinación y crecimiento de *L. sativa* cuando ésta fue incubada con extractos etanólicos de hojas de *F. campestris* (Silva et al. 2012) siguiendo la metodología descrita por Palacios et al. 2010. Esto fue correlacionado también por una elevada concentración de (-)AHA detectada por TLC en dichos extractos. Estas diferencias entre nuestros resultados y aquellos de Palacios et al. (2010) podrían

atribuirse a efectos específicos de especie. En la actualidad se están realizando ensayos para evaluar los efectos fitotóxicos de (-)AHA sobre malezas y especies de cultivo con el objetivo de explorar su potencial como herbicida natural y como agente alelopático en su ambiente natural.

Basados en una estrecha correlación entre las concentraciones del compuesto bioactivo determinadas por GC-FID y por TLC-2D, se propuso esta última como una técnica de screening rápida y sencilla para identificar y semi-cuantificar la presencia de (-)AHA en extractos de plantas (Silva et al. 2012). Esta técnica podría ser de particular importancia para investigar nuevas fuentes del compuesto en relación a su potencial como agente herbicida y a su participación en nuestros ecosistemas naturales.

Los aceites esenciales han sido propuestos como la fuente de numerosos aleloquímicos con actividad fitotóxica en una gran variedad de vegetales (Weidenhamer et al. 1993, Dayan y Duke 2006, Mancini et al. 2009). Los compuestos volátiles constituyen una fracción típicamente asociada con los aceites esenciales, pero obtenida mediante otra metodología. Debido a que la fracción volátil emitida cumple un papel fundamental en la vida de una planta, se decidió evaluar en la presente tesis dichos compuestos mediante la absorción con microfibras (HS-SPME). Diferentes estudios demostraron que las metodologías de HD y HS-SPME deberían utilizarse en forma complementaria a fin de obtener una caracterización completa de los llamados aceites esenciales vegetales (El Amine Dib et al. 2010, Nezhadali y Zarrabi-Shirvan 2010).

Mediante microextracción (HS-SPME) y el uso de GC y GC-MS se identificaron 23 compuestos en *F. campestris*, 4 monoterpenos y 19 sesquiterpenos, y 16 compuestos en *F. oolepis*, 3 monoterpenos y 13 sesquiterpenos. Los resultados obtenidos en esta tesis son los primeros reportes en *F. campestris* sobre la composición de volátiles de hoja seca (Silva et al. 2012). En *F. oolepis* han sido aislados sesquiterpenos y flavonoides (Guerreiro et al. 1979), y se ha reportado la composición de los aceites esenciales de plantas recolectadas en la Provincia de Córdoba, (Priotti et al. 1997 - τ -cadinol (10,5%), β -selinene (9,8%), linalool (8,2%) y β -eudesmo) y en la Provincia de San Luis (Garcias et al. 2007 - 38 compuestos, entre ellos destacados, τ -Muurolene (6,14%), antolinetriene (6,22%), 2-methylene-4,8,8-trimethyl-4-vinyl-bicyclo[5.2.0]nonane (10,15%), δ -cadinene (10,27%), gurjunene (20,69%)). Al comparar nuestros resultados con los obtenidos por Priotti et al. (1997) y por Garcias et al. (2007), no sólo observamos una composición muy diferente de los aceites esenciales, sino que también una tasa menor de terpenos oxigenados, lo que nos sugiere una mayor volatilización de los aceites y la posible presencia de quimiotipos dentro de la especie (Garcias et al. 2007).

Al igual que lo documentado para otras especies (Mancini et al. 2009), en las dos especies estudiadas se observó una marcada diferencia estacional en la composición de volátiles. La fracción de monoterpenos se incrementó en verano, mientras que la de sesquiterpenos disminuyó, indicando una mayor producción de sesquiterpenos durante la primavera. En ambas especies el crecimiento vegetativo y el rebrote a partir de las estructuras perennantes tienen lugar durante la primavera, mientras que la floración y producción de semillas se concentra durante el verano, período que coincide con la menor producción de terpenos oxigenados, lo que permitiría una mayor volatilización de los aceites esenciales en este período. Por lo tanto, las etapas fenológicas de la planta, como las condiciones ambientales, podrían regular la composición de los aceites esenciales, al punto de producir compuestos específicos para cada estación. De hecho, nuestros datos muestran que 18 compuestos fueron exclusivamente fabricados ya sea en primavera (1 monoterpenoides y 10 sesquiterpenoides) o en verano (3 monoterpenoides y 6 sesquiterpenoides) (Tabla 5.10). Es más, hallamos 10 compuestos (2 monoterpenos y

8 sesquiterpenos) que sólo son producidos por *F. campestris* y 4 propios de *F. oolepis* (4 sesquiterpenos), lo que estaría en concordancia con una posible quimiotaxonomía característica del género. En la actualidad, mediante el uso de diversas metodologías analíticas (Bendz et al. 1974, Barberio et al. 1991, Schulz et al. 2004) la quimiotaxonomía vegetal ha llegado a determinar variaciones entre especies en un mismo género, la época de recolección del material estudiado y hasta su ubicación geográfica (Smith 1976, Marengo et al. 1991, Sharkey y Yeh 2001, Staudt et al. 2001, Loreto 2002, Staudt et al. 2008).

Como se ha documentado en el capítulo anterior, los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación (HD) de hojas secas de *F. campestris* no mostraron efectos fitotóxicos, mientras que los de *F. oolepis* sólo mostraron efectos leves sobre los crecimientos de raíces y tallos de *L. sativa*. Según lo observado mediante TLC-2D, el (-)AHA no estuvo presente en esta fracción, lo cual concuerda con los datos obtenidos en los bioensayos. A su vez mediante la técnica de TLC se comprobó que el (-)AHA puro presenta una mayor polaridad en comparación con los compuestos presentes en los aceites esenciales, otra vez, sugiriendo que su principal vía de liberación sería por arrastre con las precipitaciones.

En cuanto a la posible actividad fitotóxica de los compuestos presentes en los aceites esenciales, estudios previos han logrado correlacionar positivamente el número de terpenos oxigenados con una mayor actividad biológica (Vokou et al. 2003, Rolim de Almeida et al. 2010). Por lo tanto, la falta de efectos fitotóxicos de *F. campestris* y los leves efectos obtenidos en la fracción volátil de los aceites esenciales de *F. oolepis*, podrían ser parcialmente explicados por las bajas contribuciones de monoterpenos oxigenados (menores al 8 %, Tabla 5.10). Por otra parte, Verdeguer et al. (2009) han demostrado que los aceites esenciales de *Eucalyptus camaldulensis* rico en espatulenol (sesquiterpeno oxigenado) inhiben completamente la germinación de *Amaranthus hybridus* y *Portulaca oleracea*. Sin embargo, aunque el espatulenol fue un componente mayoritario en volátiles de *F. campestris* en verano, en los bioensayos realizados en nuestro laboratorio con *L. sativa* no se observaron efectos inhibitorios. Mayores estudios deberán ser realizados con los aceites esenciales de *F. campestris* y *F. oolepis* sobre otras especies distintas a la lechuga de manera de evaluar potenciales efectos fitotóxicos.

Todas y cada una de las hipótesis planteadas han podido ser contrastadas durante la ejecución de este trabajo.

5.5.- CONCLUSIONES

En el presente trabajo se focalizó la elucidación de los efectos fitotóxicos de *F. campestris*. Se demostró que esta especie endémica es capaz de producir un compuesto fitotóxico novel identificado como (-)AHA. En bioensayos utilizando *L. sativa*, el compuesto inhibió drásticamente la germinación y arrestó completamente el crecimiento de raíces y tallos a concentraciones menores a 4 mM. El fitocompuesto sería secretado por los tricomas glandulares y acumulado fuera de la cutícula sobre la superficie foliar, siendo fácilmente extraído con agua, tanto de hojas frescas como secas. Estos hechos sugieren su rol como agente aleloquímico y un potencial como agente herbicida natural. Teniendo en cuenta que se encuentra en altas concentraciones en hoja e inflorescencia, y en menor concentración en raíz, su producción sería de tipo constitutiva y no se descarta que posea otro tipo de actividad biológica, como ha sido documentado para este tipo de bisabolanoideos. El (-)AHA fue detectado en *F. oolepis* en al menos 10 veces menor concentración tanto en hojas como en flores. Ensayos preliminares mostraron su ausencia en otras especies de Asteraceae y se postula su

posible participación en la quimiotaxonomía del género *Flourensia*. Los compuestos volátiles identificados en *F. campestris* y *F. oolepis* mostraron una amplia variación estacional en sus concentraciones. El (-)AHA no se encontró en los aceites esenciales de las especies estudiadas. Algunos de los compuestos identificados han sido propuestos como fitotóxicos sobre otras especies vegetales por lo que no se descarta su posible participación en acciones alelopáticas. Basado en los resultados del presente estudio, se postula que el (-)AHA, y probablemente otros compuestos aquí descritos, podrían estar íntimamente involucrados en las estrategias adaptativas de *F. campestris* y *F. oolepis* en su ambiente natural.

Capítulo 6

DISCUSIÓN GENERAL

La distribución de las plantas se halla asociada con sus diferentes formas de respuesta al medio en que habitan, desarrollando numerosas adaptaciones morfológicas y fisiológicas que determinan su capacidad para sobrevivir y crecer. La zona centro de Argentina, especialmente el Bosque Serrano de la provincia de Córdoba, se caracteriza por poseer una elevada riqueza de especies vegetales nativas y endémicas, con potencial valor medicinal y agroindustrial, este es el caso de *Flourensia campestris* y *F. oolepis*. En las últimas décadas la presión sobre las poblaciones naturales, de ambas especies, se ha incrementado drásticamente debido a los incendios periódicos que provocan desequilibrios ecológicos al tener un efecto directo sobre el balance hídrico y el suelo (Nuñez y Cantero 2000, Dennis et al. 2001). A esto debemos sumarle las características propias del gradiente ambiental en el que habitan, hallándose expuestas a diversos factores de estrés como la sequía, la baja disponibilidad de nutrientes, la exposición a altas irradiancias y elevados niveles de UV-B. Fue la meta del presente trabajo encontrar algunas de estas estrategias adaptativas, es por ello que en esta tesis se evaluó en *Flourensia campestris* y *F. oolepis*, las características del ciclo de vida, las adaptaciones morfo-anatómicas, la asignación de recursos, el éxito reproductivo y el grado de asociación micorrícica en poblaciones naturales. Asimismo, se determinó la presencia de aleloquímicos con actividad fitotóxica que pudieran estar involucrados en la ecofisiología de estas especies. Para ello i) se estudiaron los mecanismos y adaptaciones funcionales involucrados en la tolerancia de estas especies a factores de estrés abiótico; ii) se determinó la presencia de aleloquímicos con actividad fitotóxica y iii) se aislaron e identificaron los compuestos bioactivos de los extractos acuosos y aceites esenciales. El objetivo de este último Capítulo es resaltar los principales resultados y conclusiones discutiendo su relevancia.

6.1. PRINCIPALES RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1.1.- Adaptaciones morfológicas y anatómicas involucradas en la persistencia de *Flourensia campestris* y *Flourensia oolepis* en ambientes naturales.

Las especies estudiadas presentan un vástago principal ortótropo con crecimiento continuo y definido, con ramificaciones vegetativas ortótropas acrotónicas y simpodiales, y con inflorescencias (panículas de capítulos - Rua 1999). El desarrollo de las reiteraciones produce cambios en la forma de la planta, las cuales pueden originarse a partir de tres vías diferentes: de las yemas adventicias del xilopodio; de yemas remanentes a lo largo del eje principal, en ambos casos basitónicas; y las originadas por la segunda yema axilar en algunos de los vástagos reproductivos, luego de la floración – reiteraciones acrotónicas. El “continuum arquitectural” (Hallé com. pers.) y las variaciones arquitecturales presentes en ambas especies, son la resultante de la interacción entre el patrón intrínseco de las mismas y el ambiente en que crecen, siendo la totipotencia de los meristemas lo que les permite este grado de plasticidad (Bell 1994).

En relación a la exo y endomorfología de *F. campestris* y *F. oolepis* la hipótesis planteaba que en función a las características del ambiente en que habitan, estas especies presentarían adaptaciones comunes a especies xerófitas, tales como raíces profundas y órganos de almacenamiento subterráneos (xilopodios). En ambas especies observamos la presencia de un xilopodio formado por el hipocótilo y la raíz, tratándose de especies hemicriptófitas (sensu Raunkiaer 1934), ya que pueden originar yemas de innovación a partir del xilopodio, las cuales producen vástagos accesorios que reemplacen parcial o totalmente la parte aérea de la planta frente a eventos de estrés

muy severos, o disturbios ambientales tales como incendios. Esta constituye una estrategia adaptativa clave para la persistencia de *Flourensia* en su hábitat natural. La capacidad de desarrollar yemas múltiples –seriales- Tomlinson (1978) en la base de las panículas de capítulos que se secan y caen, luego de la fructificación, constituye otra valiosa adaptación, que permite la producción de vástagos vegetativos cuando las condiciones ambientales son desfavorables pero no extremas (fuego).

El análisis de la endomorfología permitió identificar algunas características propias de especies xerofíticas, como la presencia en hojas de un mesófilo isolateral, clorénquima en empalizada hacia ambas epidermis y fibras por debajo de la epidermis. En algunos casos, en particular en *F. campestris*, observamos la presencia de una hipodermis que resulta característica de especies de ambientes sometidos a estrés abiótico. En las raíces con crecimiento secundario también se observó la presencia de súber de origen superficial y abundantes fibras. El escaso número de capas de células corticales encontrado reduciría la resistencia al flujo del agua en las raíces, disminuyendo el recorrido hasta el sistema de conducción (Esau 1965, Fahn y Cutler 1992). Las mediciones realizadas sobre los vasos xilemáticos mostraron, que ambas especies poseen vasos con diámetros muy por debajo de 30 μm , lo que le conferiría resistencia a embolias por congelamiento (Davis et al. 1999, Durante et al. 2010), siendo éste un carácter adaptativo en los ambientes en los que crecen, los cuales pueden registrar temperaturas inferiores a 0 °C.

F. campestris y *F. oolepis* presentan dos tipos de estructuras secretoras: los tricomas glandulares y los conductos secretores. Las hojas poseen la mayor densidad de tricomas glandulares, encontrándose mayormente distribuidos en la cara adaxial en *F. campestris* y preferentemente asociados a los nervios en ambas especies. Cabe señalar que nuestros resultados son los primeros en reportar presencia de estos tricomas en las brácteas con similar distribución al encontrado en hojas. En tallos jóvenes los tricomas se hallan en densidades muy bajas. Nuestros estudios son los primeros en documentar la ultraestructura de estos tricomas, y la forma en que las sustancias que éstos producen son excretadas al exterior. Las células de la cabezuela de los tricomas en el estadio de activa secreción se caracterizan por poseer componentes típicos de tricomas glandulares productores y secretores de compuestos de tipo lipofílico (Fahn 2000, Bartoli et al. 2011). En relación a la forma en que las sustancias son excretadas, se observaron diferencias entre ambas especies. Los conductos secretores o resiníferos se encuentran distribuidos en todos los órganos de las plantas, tanto vegetativos como reproductivos. La existencia de una vaina parenquimática en estos canales, sugiere que podría cumplir la función de impedir que las sustancias producidas por los conductos se trasladen a otras células / tejidos, compartimentalizando a las mismas, lo que insinuaría la posible naturaleza fitotóxica de los compuestos producidos en los conductos. En ambas especies, la mayor densidad de conductos se encontró en el floema secundario de tallos secundarios, mientras que los conductos de mayor diámetro se observaron en la corteza de los tallos secundarios y en la base de los capítulos. La localización de los conductos en el floema secundario, y por ende, muy cercanos al súber, facilitaría la excreción de las sustancias producidas hacia el exterior a través de las lenticelas. En plantas de *F. campestris* y *F. oolepis* creciendo en poblaciones naturales, es muy frecuente encontrar resinas sobre la superficie de los tallos, las cuales aparecen en forma de gota con distinta coloración (amarillenta a ferruginosa) y consistencia (más o menos viscosa), probablemente asociado al grado de oxidación que presenten los compuestos. En una extensa revisión de la anatomía de las maderas de Compuestas (Carlquist 1966), se menciona que es común encontrar depósitos de materiales de tipo resinoso en esta

familia y que en general se presentan como gotas diminutas en el lumen celular de uno o más tipos de células.

En relación a la capacidad de estas especies de producir simbiosis con organismos del suelo, se determinó que ambas forman simbiosis con MA, siendo mayor el grado de colonización en *F. oolepis*. Además de la colonización por MA, en las raíces de ambas especies se observó la presencia de endofitos septados oscuros (DSE), siendo ésta la primera oportunidad en la que se reporta este tipo de simbiosis. Los resultados de los ensayos controlados mostraron claramente que las plántulas de *F. oolepis* crecidas con inóculo micorrízico produjeron en promedio 2 veces más biomasa. Estos resultados sugirieron fuertemente que el alto porcentaje de colonización MA en *F. oolepis* representaría una ventaja adaptativa, aun cuando la presencia de arbusculos fue nula. El grado de colonización y dependencia micorrízica puede variar aún dentro de una misma especie que habita en distintos ambientes (Brundett 1991), por lo que no sería raro encontrar que *F. campestris* pueda presentar otra respuesta. La colonización simultánea de MA y DSE, común en regiones semiáridas, sugiere fuertemente que este tipo de asociaciones juega un rol importante en estos ecosistemas, aumentando la eficiencia en el uso del agua y el fitness general de las plantas (Mandyam y Jumpponen 2005, Muthukumar et al. 2006).

Los resultados de los estudios realizados en *F. campestris* y *F. oolepis* han demostrado que éstas comparten características propias de especies adaptadas a condiciones xeromórficas, concediéndoles ventajas adaptativas para la supervivencia en los ambientes que habitan. Asimismo, la capacidad de generar simbiosis simultánea (MA y DSE) sería de vital importancia, aumentando la competitividad de estas especies en las comunidades de las que forman parte.

6.1.2.- Adaptaciones funcionales en *F. campestris* y *F. oolepis* que les facilitan su persistencia en ambientes naturales.

Existe consenso que en las plantas, los patrones de asignación de recursos entre las diferentes estructuras y funciones, responden a adaptaciones que aumentan el fitness de las mismas en los sitios que habitan (Gadgil y Solbrig 1972, Chapin 1980, Mooney 1983, Schulze et al. 1983, Obeso 2002). Siendo la fecundidad y la producción de semillas componentes fundamentales del fitness, es esperable que las plantas maximicen la asignación de recursos hacia ambas (Alpert et al. 1985). Sin embargo, existe un compromiso entre la asignación de recursos que se deriva hacia el crecimiento vegetativo, la supervivencia (defensas) y la reproducción sexual (Obeso 2002), y la capacidad de las plantas de compatibilizar ambos procesos dependerá tanto de la plasticidad fenotípica en su patrón de crecimiento (destino de los meristemas y la arquitectura) como en los mecanismos específicos que les permitan compensar los costos de la reproducción (e.g.: crecimiento compensatorio e incremento de la actividad fotosintética, la contribución a la fotosíntesis de estructuras reproductiva, la reabsorción de nutrientes de estructuras senescente, etc.) (Tuomi et al. 1994, Obeso 2002).

En los estudios realizados en *F. campestris* y *F. oolepis* para determinar los patrones de asignación de recursos entre las distintas estructuras y funciones dentro de la planta - en particular el crecimiento vegetativo y reproductivo- ambas especies mostraron plasticidad en relación a su capacidad de respuesta frente a variaciones en las condiciones ambientales durante distintos ciclos de crecimiento. Los módulos vegetativos (MV) y reproductivos (MR) mostraron que la biomasa de los MV es siempre superior a la de los MR. Los resultados en relación al crecimiento (biomasa) de los MV y MR mostraron que en términos generales, los MV acumularon mayor

cantidad de biomasa durante una estación de crecimiento, respecto a los MR (Figura 3.4). Esto se relaciona con la calidad de la biomasa producida, ya que en los MR la producción de otras estructuras, en particular las semillas, con mayor contenido proteico y lipídico, resulta biosintéticamente más costoso que la producción de hojas y tallos. La variación observada entre años para cada tipo de módulo permitió reconocer que estas especies pueden responder en forma plástica al ambiente, sobre todo aumentando su crecimiento cuando las precipitaciones son mayores durante el ciclo de crecimiento. En la asignación de recursos dentro de los módulos, la mayor inversión se produce en hojas, seguida por los tallos y las estructuras reproductivas (MR). Las relaciones entre la biomasa total producida por cada tipo de módulo y la biomasa de las hojas resultaron positivas y significativas, manteniéndose en ambas especies y años estudiados. El número de hojas fue la variable que registró mayores cambios tanto en los MV como en los MR, mientras que el peso/hoja permaneció constante.

Los tallos en cambio, mostraron menor plasticidad, respondiendo al aumento de la biomasa total con un incremento menos que proporcional. La única variable afectada fue la longitud, aumentando bajo condiciones climáticas más favorables. El diámetro y el peso específico de los tallos, en general, no mostraron diferencias entre años. Estos resultados muestran claramente que estas especies priorizan la producción de estructuras fotosintetizantes sobre las de sostén. La producción de semillas varió en forma importante entre años, sobre todo en *F. oolepis*, afectando en forma negativa el peso de cada semilla individual. Estos resultados sugieren que si bien las plantas exhiben algún grado de plasticidad en relación a estas variables, la posibilidad de mantener un peso constante de semilla podría estar limitado por la fuente de fotoasimilados (hojas) que estarían restringidas primariamente a las hojas que se encuentran en el MR, y al mayor costo biosintético relacionado con el tipo de compuestos que contienen las semillas. En *F. campestris*, al menos, el mayor peso específico foliar (g/cm) de las hojas presentes en los MR respecto a las hojas de los MV, y su mayor capacidad de retranslocación en la etapa de senescencia sugieren un carácter adaptativo de estos atributos, que contribuirían a reducir o compensar los costos de la reproducción.

Las semillas por su parte, mostraron que la germinación está controlada por la temperatura y no la luz. Las temperaturas constantes resultan más favorables que las alternadas, aumentando la velocidad de germinación; se especula que este sería un mecanismo que les permitiría censar la profundidad a la que se encuentran ubicadas las semillas. La viabilidad de las semillas estuvo relacionada con las condiciones ambientales en las que se produjeron; los valores más altos correspondieron a años con mayores precipitaciones durante el ciclo de crecimiento. Asimismo, es importante mencionar que dentro de las semillas no viables, entre el 10-25 % de las semillas recolectadas de poblaciones naturales presentaron insectos, adultos o pupas, de por lo menos 2 especies de avispas que aún no han sido identificadas (datos no presentados). Resultados sobre el mantenimiento de la viabilidad en condiciones controladas sugieren que las semillas no deben formar bancos persistentes, por lo que el mantenimiento de las semillas en el banco debería reponerse anualmente a expensas de la reproducción sexual. De todas maneras, a partir de las observaciones realizadas a campo durante todos estos años podemos concluir que los eventos de germinación y emergencia no son frecuentes en las condiciones naturales típicas. En general, el mayor reclutamiento de plántulas se observa en sitios que han sufrido algún tipo de disturbio, particularmente remoción de suelo, ya sea por causas antrópicas (e.g., bordos de caminos, mantenimiento de accesos) o por acción de la fauna local. Sin embargo, la posibilidad de respuesta frente a disturbios es importante en el aumento del número de individuos en poblaciones ya instaladas y en la colonización de nuevas áreas.

6.1.3.- Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica en *F. campestris* y *F. oolepis*.

Los procesos de lixiviación de compuestos fitotóxicos de las plantas son de particular interés en regiones áridas y semiáridas como la estudiada, en donde la germinación se halla estrictamente controlada por la temperatura y las precipitaciones estacionales. En los casos de *F. campestris* (FC) y *F. oolepis* (FO), dos especies nativas con un alto grado de adaptación, el lavado de sus hojas y órganos durante las lluvias, o la emanación de compuestos volátiles, podrían ejercer un importante efecto sobre la germinación del banco de semillas, facilitando así su competencia en estos ambientes limitados de recursos.

Se ha demostrado que los extractos acuosos (EAq) de hojas de *F. campestris* poseen un potente efecto fitotóxico sobre la germinación y el crecimiento de raíz y tallo de *L. sativa*. Este efecto fue menor pero se halló también presente en otros órganos de la planta. En EAq de *F. oolepis* los efectos fitotóxicos fueron menores y limitados sólo al crecimiento de *L. sativa*. Los componentes responsables de los efectos fitotóxicos en los EAq fueron extraídos con solventes (EtOAc), revelando así que formaban parte de los metabolitos secundarios. A partir de aquí se aisló e identificó el (-)-ácido hamanásico A ((-)-AHA) como el aleloquímico novel responsable de las actividades fitotóxicas descriptas. Las diferencias encontradas entre las bioactividades de los extractos acuosos de los distintos órganos y de las distintas especies se correlacionaron con la concentración del biocompuesto medida posteriormente en cada uno de ellos.

El hecho de que (-)-AHA pudiera ser aislado de extractos acuosos de hojas tanto secas como frescas de *F. campestris* sugiere un rol biogénicamente determinado que estaría operando durante y después del ciclo de vida de las hojas. Los resultados mostraron que el biocompuesto se halla presente en todos los órganos, con concentraciones excepcionalmente altas y similares en hojas e inflorescencias (al menos 10 veces más en *F. campestris* que en *F. oolepis*) y mucho menores en raíces. Este perfil entre órganos coincide con la distribución de metabolitos secundarios citados en otras especies (Ferreira et al. 1995). El hecho de que el compuesto se halle presente en todos los órganos de la planta indicaría que se produce en forma constitutiva como un importante mecanismo de defensa sobre todo en *F. campestris*, probablemente con diferentes funciones y mecanismos de acción.

Cuando comparamos los contenidos de (-)-AHA entre las diferentes poblaciones de *F. campestris* y *F. oolepis*, no sólo se mantuvieron las diferencias entre especies, sino que a su vez se hallaron diferencias significativas por área muestreada, lo que podría deberse a diferentes grados de lixiviación por las precipitaciones o estímulos involucrados con factores de estrés abióticos, como los encontrados en estas regiones (e.g., alta irradiancia, escasas precipitaciones, déficit de nutrientes, entre otras).

Los resultados mostraron que cerca del 30 % de los depósitos presentes en las hojas de *F. campestris* pudieron ser recuperados en los extractos acuosos, lo que indicaría que el lixiviado por agua de lluvia sería la vía principal de liberación del compuesto bioactivo al ambiente. Este tipo de liberación de compuestos fitotóxicos puede ser de particular importancia en regiones áridas y semiáridas, en las cuales la germinación se halla limitada por la temperatura y precipitaciones estacionales. En el caso de *F. campestris*, la lixiviación de (-)-AHA a partir de las hojas durante las lluvias podría ejercer un importante efecto inhibitorio sobre la germinación del banco de semillas, reduciendo así la potencial competencia en estos medios limitados de recursos.

Los presentes estudios sobre las características morfo-anatómicas, y otros, estarían mostrando evidencias consistentes con que el (-)-AHA es secretado por los tricomas

glandulares: i) extracciones rápidas (10 a 15 s) de hojas frescas de *F. campestris* en EtOAc o agua revelaron una alta concentración del compuesto bioactivo, representando el 20-30 % del total de metabolitos secundarios acumulados en superficie (datos no mostrados); ii) los órganos con los mayores contenidos del compuesto presentan alta densidad de tricomas glandulares con secreciones lipofílicas (ver Capítulo 2); iii) el isómero (+)AHA fue hallado en alta concentración en la fracción aislada de tricomas glandulares de hojas de *R. rugosa* (Hashidoko y Urashima 1995). Además, existe un creciente consenso acerca de que los compuestos secundarios que se acumulan por fuera de la cutícula en la superficie de las plantas (terpenoides, fenilpropanoides, etc.) son casi exclusivamente producidos por tricomas glandulares secretores (Urzúa 2004, Wagner et al. 2004). Sin embargo, es interesante el caso de las raíces, en donde no se evidenciaron tricomas glandulares pero sí se detectó la presencia del (-)AHA. Los mecanismos y sitios de síntesis del (-)AHA, así como su posible translocación a otros tejidos y su secreción específica son motivo de análisis y están siendo enfocados con distintos experimentos en la actualidad en nuestro laboratorio.

De acuerdo a los resultados citados y a la distribución general del (-)AHA encontrada en *F. campestris*, se podría especular que el compuesto bioactivo poseería efectos alelopáticos sobre la vegetación vecina mediados por lixiviación, manifestando incluso un mayor espectro de actividades biológicas en diferentes partes de la planta durante los diferentes estadios de desarrollo. Así, el grado de impacto o la significancia ecológica del (-)AHA deberá ser elucidada.

Entre los efectos fitotóxicos encontrados, el crecimiento de raíz de *L. sativa* fue la variable más sensible, seguida por el crecimiento de tallo y la germinación. Estos datos concuerdan con numerosos estudios en otras especies, donde se demostró que el crecimiento radicular presenta una mayor sensibilidad en plantas que crecen en presencia de compuestos alelopáticos (Hamdi et al. 2001; Parvez et al. 2003; Punjani et al. 2006; Abdelgaleil y Hashinaga 2007; Ercoli et al. 2007). Cabe destacar que a diferencia de lo hallado en *F. campestris*, en ninguno de los bioensayos con *F. oolepis* se observaron cambios en la morfología externa de la radícula de *L. sativa*. Estas diferencias en los efectos fitotóxicos entre ambas especies dan cuenta, por un lado, de las diferencias de concentración del (-)AHA y, por otro, de distintos compuestos fitotóxicos con actividad específica de cada especie, como fue demostrado por Palacios et al. (2007), utilizando extractos etanólicos de *F. oolepis* sobre *A. sativa* y *R. sativa*.

A modo de comprender cuál es la importancia de esta potencial estrategia adaptativa de *F. campestris* en su ecosistema, se hace imprescindible investigar el efecto del (-)AHA sobre las distintas especies con las que compite. En la actualidad se están realizando ensayos para evaluar los efectos fitotóxicos de (-)AHA sobre malezas y especies de cultivo con el objetivo de explorar su potencial como herbicida natural y como agente alelopático en su ambiente natural.

La fracción correspondiente a los aceites esenciales (AcEs) de las plantas es también una abundante fuente de metabolitos secundarios con actividad fitotóxica (Weidenhamer et al. 1993, Dayan y Duke 2006; Mancini et al. 2009), sin embargo los AcEs de ambas especies de *Flourensia* no mostraron efectos fitotóxicos, aunque no se descartan posibles efectos fitotóxicos de estas fracciones sobre otras especies vegetales. Como hallazgo inesperado del presente estudio, caben destacarse los efectos estimulantes de los AcEs de *F. campestris* sobre el crecimiento de raíz de *L. sativa* (Capítulo 4), no hallándose efectos significativos sobre la elongación del tallo ni sobre la germinación de *L. sativa*.

Trabajos recientes sugieren que los compuestos volátiles, producidos en las hojas, podrían contribuir en las interacciones entre plantas, y con otros organismos en la

rizósfera, mediante la unión de estos compuestos a las partículas del suelo o por absorción directa de las plántulas en desarrollo (Weston 2005). El carácter apolar de estos compuestos les permitiría permanecer en suelo (al no ser arrastrados por el agua) e ingresar más fácilmente a través de membranas biológicas a fin de ejercer su acción.

Estas diferencias entre nuestros resultados y aquellos de Palacios et al. (2010) podrían atribuirse a efectos específicos de la especie. Basados en una estrecha correlación entre las concentraciones del compuesto bioactivo determinadas por GC-FID y por TLC-2D, se propuso esta última como una técnica de screening rápida y sencilla para identificar y semi-cuantificar la presencia de (-)-AHA en extractos de plantas (Silva et al. 2012). Esta técnica podría ser de particular importancia para investigar nuevas fuentes del compuesto en relación a su potencial como agente herbicida y a su participación en los ecosistemas naturales.

Los aceites esenciales han sido propuestos como la fuente de numerosos aleloquímicos con actividad fitotóxica en una gran variedad de vegetales (Weidenhamer et al. 1993, Dayan y Duke 2006, Mancini et al. 2009). Los compuestos volátiles constituyen una fracción típicamente asociada con los aceites esenciales, pero obtenida mediante otra metodología. Debido a que la fracción volátil emitida cumple un papel fundamental en la vida de una planta, se decidió evaluar en la presente tesis dichos compuestos mediante la absorción con microfibras (HS-SPME). Diferentes estudios demostraron que las metodologías de HD y HS-SPME deberían utilizarse en forma complementaria a fin de obtener una caracterización completa de los llamados aceites esenciales vegetales (El Amine Dib et al. 2010, Nezhadali y Zarrabi-Shirvan 2010).

Mediante microextracción (HS-SPME) y el uso de GC y GC-MS se identificaron 23 compuestos en *F. campestris*, 4 monoterpenos y 19 sesquiterpenos, y 16 compuestos en *F. oolepis*, 3 monoterpenos y 13 sesquiterpenos. Los resultados obtenidos en esta tesis son los primeros reportes en *F. campestris* sobre la composición de volátiles de hoja seca (Silva et al. 2012). Al comparar nuestros resultados con los obtenidos por Priotti et al. (1997) y por Garcias et al. (2007), no solo observamos una composición muy diferente de los aceites esenciales, sino que también una tasa menor de terpenos oxigenados, lo que nos sugiere una mayor volatilización de los aceites y la posible presencia de quimiotipos dentro de la especie (Garcias et al. 2007).

Al igual que lo documentado para otras especies (Mancini et al. 2009), en las dos especies estudiadas se observó una marcada diferencia estacional en la composición de volátiles. Por lo tanto, las etapas fenológicas de la planta, como las condiciones ambientales, podrían regular la composición de los aceites esenciales, al punto de producir compuestos específicos para cada estación. De hecho, nuestros datos muestran que 18 compuestos fueron exclusivamente producidos ya sea en primavera (1 monoterpenoide y 10 sesquiterpenoides) o en verano (3 monoterpenoides y 6 sesquiterpenoides) (Tabla 5.10). Estas variaciones estacionales en la producción de metabolitos secundarios indican claramente un mecanismo de respuesta o de defensa de las plantas en estudio, constituyéndose probablemente en otra de las estrategias adaptativas. Por otro lado, hallamos 10 compuestos (2 monoterpenos y 8 sesquiterpenos) que sólo son producidos por *F. campestris* y 4 propios de *F. oolepis* (4 sesquiterpenos), lo que estaría en concordancia con una posible quimiotaxonomía característica del género. Al contar con metabolitos con acción fitotóxica comprobada (e.g., espatulenol) sobre otras especies distintas a la lechuga, mayores estudios deberán ser realizados con los AcEs de *F. campestris* y *F. oolepis* sobre otras especies con las cuales cohabitan. Cabe aquí mencionar que no se han estudiado en estas fracciones otros de los efectos comprobados de los AcEs de las plantas relacionados a estrategias

adaptativas, tales como efectos insecticidas, de atracción a agentes polinizadores, etc., lo que abre un amplio espectro para futuras investigaciones.

6.2. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se determinaron características y mecanismos funcionales que se hallarían íntimamente involucrados con la ecofisiología de *F. campestris* y *F. oolepis*. A nivel exo- y endomorfológico, se demostró que comparten características propias de especies adaptadas a condiciones xeromórficas, como la presencia de estructuras perennantes como el xilopodio, estructuras secretoras, tricomas y conductos resiníferos, y vasos xilemáticos resistentes a embolias por congelamiento. Estas características le otorgarían, a ambas especies, ventajas adaptativas para su supervivencia en los ambientes que habitan.

Tanto *F. campestris* como *F. oolepis* presentaron la capacidad de establecer simbiosis con micorrizas arbusculares y endofitos septados oscuros en forma simultánea. Como se ha sido sugerido para otros ecosistemas áridos, este tipo de asociaciones serían de vital importancia, aumentando la competitividad de estas especies en las comunidades de las que forman parte.

En relación con posibles efectos fitotóxicos alelopáticos, se demostró que estas especies son capaces, en mayor medida *F. campestris*, de producir un compuesto fitotóxico novel identificado como (-)AHA. En bioensayos utilizando *L. sativa*, el compuesto inhibió drásticamente la germinación y arrestó completamente el crecimiento de raíces y tallos a concentraciones menores a 4 mM. El fitocompuesto sería secretado por los tricomas glandulares, identificados en gran concentración en hojas y flores, y acumulado fuera de la cutícula sobre la superficie foliar, siendo fácilmente extraído con agua, tanto de hojas frescas como secas. Estos hechos sugieren su rol como agente aleloquímico y un potencial como agente herbicida natural. Teniendo en cuenta que se encuentra en altas concentraciones en hoja e inflorescencia, y en menor concentración en raíz, su producción sería de tipo constitutiva y no se descarta que posea otro tipo de actividad biológica, como ha sido documentado para este tipo de bisabolanoídes. Complementariamente, se ha diseñado una técnica de screening (TLC-2D) que será de particular importancia para investigar nuevas fuentes del compuesto en relación a su potencial como agente herbicida y a su participación en nuestros ecosistemas naturales.

Los AcEs de *F. campestris* y *F. oolepis* no mostraron efectos fitotóxicos sobre *L. sativa*. Los compuestos volátiles identificados en *F. campestris* y *F. oolepis* mostraron una amplia variación estacional en sus concentraciones. El (-)AHA no se encontró en los aceites esenciales de las especies estudiadas. Algunos de los compuestos identificados han sido propuestos como fitotóxicos sobre otras especies vegetales por lo que no se descarta su posible participación en acciones alelopáticas. Basado en los resultados del presente estudio, se postula que el (-)AHA, y probablemente otros compuestos aquí descritos, podrían estar íntimamente involucrados en las estrategias adaptativas de *F. campestris* y *F. oolepis* en su ambiente natural.

Mayores estudios son necesarios a fin de evaluar la participación del (-)AHA en la ecofisiología de estas especies. Como proyección de los resultados mostrados, se desprenden las siguientes propuestas concretas para profundizar los estudios y superar las limitaciones planteadas:

1. Explorar el efecto fitotóxico de extractos acuosos de hojas de *F. campestris* y del biocompuesto aislado en competidores, malezas y especies de cultivo.

- ¿El efecto fitotóxico es selectivo o de amplio espectro?, ¿cuál es su participación en el mantenimiento de las poblaciones naturales?, ¿cuál es el potencial del biocompuesto como agroquímico?
2. Explorar el efecto herbicida alelopático de extractos acuosos de hojas de *F. campestris* y del (-)AHA puro utilizando el sustrato suelo.
¿Se conserva el efecto fitotóxico sobre *L. sativa* cuando el sustrato es suelo estéril?, ¿a qué concentraciones se manifiesta?, ¿predomina la inhibición de la germinación o del crecimiento?, ¿cuál es el efecto si se utiliza suelo no estéril?, ¿se manifiestan en éste los efectos fitotóxicos de *F. campestris* sobre especies competidoras del lugar?
 3. Determinar la autotoxicidad de extractos acuosos de hojas de *F. campestris* y de (-)AHA.
¿Existe autotoxicidad en *F. campestris*?, ¿se manifiesta en la inhibición de su propia germinación o crecimiento?
 4. Determinar el sitio de producción y secreción del (-)AHA en los distintos órganos de *F. campestris*.
¿Cuáles son las células encargadas de producir el (-)AHA en cada órgano de *F. campestris*?, sólo los pelos glandulares lo producen y lo secretan hacia el exterior?, en tallos secundarios y raíces, ¿dónde se localiza?, ¿están las estructuras donde se producen asociadas al sistema de conducción?, ¿pueden observarse células de transferencia entre los sitios de producción y las células circundantes?
 5. Explorar el mecanismo de acción fitotóxica del (-)AHA, empleando *Lactuca sativa* como modelo.
¿Cuál es la histolocalización del compuesto una vez absorbido por la semilla?, ¿Cuáles son las principales alteraciones histológicas?, los cambios observados, ¿son similares para todos los tejidos?, ¿se producen alteraciones en la mitosis?, ¿se modifica la permeabilidad de las membranas?, ¿se producen aumentos en las especies reactivas de oxígeno (ROS)?

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelgaleil SAM**, Hashinaga F. (2007). Allelopathic potential of two sesquiterpene lactones from *Magnolia grandiflora* L. *Biochem Syst Ecol* 35(11): 737-742.
- Abraham D**, Braguini WL, Kelmer-Bracht AM, Ishii-Iwamoto EL. (2000). Effects of our monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. *J Chem Ecol* 26: 611-624.
- Adam KP**, Zapp J. (1998). Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. *Phytochemistry* 48: 953-959.
- Aharoni Y**, Gilboa N, Silanikove N. (1998). Models of suppressive effect of tannins. Analysis of the suppressive effect of tannins on ruminal degradation by compartmental models. *Anim Feed Sci Tech* 71: 251-267.
- Aikawa J**, Ishii T, Kuramoto M, Kadoya K. (2000). Growth stimulants for vesicular-AMF in Satsuma mandarin pomace. *J Japan Soc Hort Sci* 69: 385-389.
- Akiyama K**, Matsuoka H, Hayashi H. (2002). Isolation and identification of a phosphate deficiency-induced C-glycosylflavonoid that stimulates arbuscular mycorrhiza formation in melon roots. *MPMI* 15:334-40.
- Alarcon SR**, Ocampos LSN, Flores Galleguillo LV, Pacciaroni A, Sosa VE. (2007). Phytochemistry and phytotoxic activity of *Lagascea mollis* (Asteraceae). *J Argent Chem Soc* 95: 25-31.
- Alpert P**, Newell EA, Chu C, Glyphis J, Gulmon SL, Hollinger DY, Johnson ND, Mooney HA, Patrick G. (1985). Allocation to reproduction in the chaparral shrub, *Diplacus auranticus*. *Oecologia* 66: 309-316.
- Amorín JL**, Rosow RA (1989/90/91/92) Guía taxonómica con plantas de interés farmacéutico. 2 Ed. *Dominguezia* 7(1):31-38/ 8(1):28-39/ 9(1):54-62/ 10(1):35-40.
- Antlfinger AE**, Wendel LF. (1997). Reproductive effort and floral photosynthesis in *Spiranthes cernua* (Orchidaceae). *Am J Bot* 84: 769-780.
- Apezato-da-Gloria B**, Hayashi AH, Cury G, Misaki-Soares MK, Rocha R. (2008). Occurrence of secretory structures in underground systems of seven *Asteraceae* species. *Bot J Linn Soc* 157: 789-796.
- Archer S**. (1994). Woody plant encroachment into southwestern grasslands and savannas: rates, patterns and proximate causes. En: *Ecological implications of livestock herbivory in the west*. Vavra M., Laycock WA, Pieper RD (eds). Society for Range Management, Denver, CO. Pp. 13-68.
- Augé RM**. (2001). Water relations, drought and VA mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3-42.
- Bago B**, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. (2000). Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol* 124: 949-958.
- Ballaré CL**, Scopel AL, Mazza CA. (1999). Effects of solar UV-B radiation on terrestrial ecosystems: case studies from southern south America. En: *Stratospheric ozone depletion: the effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems* Rozema J. (ed), Backhuys Pub, Leiden, The Netherlands, Pp. 293-311.
- Ballaré CL**, Scopel AL, Stapleton AE, Yanovsky MJ. (1996). Solar ultraviolet-B radiation affects seedling emergence, DNA integrity, plant morphology, growth rate and attractiveness to herbivore insects in *Datura ferox*. *Plant Physiol* 112: 161-170.
- Barberán M**, Valderrábano J. (1987). Pathological features in thymus and thyroids of lambs fed on turnips. *Vet Rec* 120: 367-368.
- Barberio J**, Twibell J. (1991). Chemotaxonomy of plant species using headspace sampling, thermal desorption and capillary GC. *High Resolut Chrom* 14: 637-639.
- Barboza GE**, Bonzani N, Filippa EM, Luján MC, Morero R, Bugatti M, Decolatti N, Ariza Espinar L. (2001). Atlas Histomorfológico de plantas de interés medicinal de uso corriente en Argentina. Museo Botánico de Córdoba. Serie Especial I. UNCOR.

- Barboza** GE, Cantero JJ, Núñez C, Ariza Espinar L. (eds.). (2006). Flora medicinal de la provincia de Córdoba (Argentina). Museo Botánico de Córdoba. Gráficamente Ediciones, Córdoba. Argentina.
- Barlow** PW. (1989). Meristems, metamers and modules and the development of shoot and root systems. *Bot J Linn Soc* 100: 255-279.
- Barlow** PW. (1994). From cell to system: repetitive units of growth in the development of roots and shoots. En: Iqbal M (ed.) *Growth Patterns in Vascular Plants* Dioscorides, Portland, Pp. 19-58.
- Barnes** J, Cardoso-Vilhena J. (1996). Interactions between electromagnetic radiation and the plant cuticle. En: *Plant Cuticles- AN integrated Fucntional Approach*. (ed.) G. Uerstiens. Bios Scientific Public Ltd. Oxford.
- Barron** D, Ibrahim RK. (1996). Isoprenylated flavonoids. Review article N°116. *Phytochemistry* 43:921-982.
- Barrow** JR, Aaltonen RE. (2001). Evaluation of the internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. roots by dark septate fungi and the influence of host physiological activity. *Mycorrhiza* 11: 199-205.
- Barrow** JR. (2003). A typical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza* 13: 239-247.
- Bartoli** CMA, Galati B, Tortosa R. (2011). Anatomical studies of the secretory structures: Glandular trichomes and ducts, in *Grindelia pulchella* Dunal (*Astereae*, *Asteraceae*). *Flora* doi:10.1016/j.flora.2011.07.012.
- Basconsuelo** S, Malpassi R, Kraus T, Bianco C, Weberling F. (1997). Growth forms of species of *Galactia* (*Leguminosae*) in southern part of the Province Córdoba, Argentina. *Beitr Biol Pflanzen* 70: 107-119.
- Baskin** CC, Baskin JM. (1998). *Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Academic Press, San Diego.
- Bazzaz** FA. (1996). *Plants in changing environments. Linking physiological, population, and community ecology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Becerra** VH. (2007). Proyecto de desarrollo de pequeños productores agropecuarios. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca.
- Bell** AD. (1991). *Plant form. An illustrated guide to flowering plant morphology*. Oxford University, Hong Kong.
- Bell** AD. (1994). A summary of the branching process in plants. En: Ingram DS, Hudson A (eds.) *Shape and Form in Plants and Fungi*. The Linnean Society of London, Pp. 119-142.
- Bendz** GJ, Santesson A. (1974). *Chemistry in Botanical Classification*, Academic Press, Londres.
- Benner** JP. (1996). Higher Crop protection agents from plants. An overview. En: Copping LG. (ed.). *Crop protection agents from nature: natural products and analogues*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England. Pp. 217-229.
- Bertran de Solis** MA. (1986). Technical Report UNEP-UNESCO MAB-6, 97.
- Bewley** JD, Black. (1985). *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Plenum Press, New York. Pp. 367.
- Bianco** CA, Weberling F, Kraus TA, Grosso M, Basconsuelo S, Malpassi R. (1998). Formas de crecimiento, distribución e importancia económica de las Leguminosas del Sur de la Provincia Córdoba. XXVI Jornadas Argentinas de Botánica, Río Cuarto. Resúmenes, N° 231.
- Bode** HR. (1940). Uder die Blattausscheidungen des Wermuts und ihre Wirkung auf andere Pflanzen. *Planta* 30: 567-589.
- Bohlmann** J, Meyer-Gauen G, Croteau R. (1998). Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *P Natl Acad Sci USA* 95: 4126-4133.
- Bornmann** JF, Vogelmann TC. (1988). Penetration of blue and UVB radiation measured by fiber optics in spruce and fir needles. *Physiol Plant* 72: 699-705.
- Botto** JF, Scopel AL, Sánchez RA. (2000). Water constraints on the photoinduction of weed seed germination during tillage. *Aust J Plant Physiol* 27:463-471.

- Boulet F, Lambers H.** (2005). Characterisation of arbuscular mycorrhizal fungi colonisation in cluster roots of shape *Hakea verrucosa* F. Muell (Proteaceae), and its effect on growth and nutrient acquisition in ultramafic soil. *Plant Soil* 269: 357-367.
- Briske DD, Heitschmidt RK.** (1991). An ecological perspective. En: Heitschmidt RK, J Stuth W (eds.) *Grazing management: An ecological perspective*. Timber, Portland Oregon. Pp. 11-26.
- Brundrett MC.** (1991). Mycorrhizas in natural ecosystems. *Adv Ecol Res* 21:171–262.
- Brundrett MC.** (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol* 2: 275-304.
- Bryant FC, Taylor CA, Merrill LB.** (1981). White tailed deer diets from pastures in excellent and poor range condition. *J Range Manage* 34: 193-200.
- Cabido MR, Zak MR.** (1999). *Vegetación del Norte de Córdoba* (eds.). Sec Agr. Ganad y Rec. Renov de Córdoba.
- Callaghan TV, Suensson BM, Bowman H, Lindley DK, Carlsson BA.** (1990). Models of clonal plant growth based on population dynamics and architecture. *Oikos* 57: 257-269.
- Callaway RM, Newingham B, Zabinski CA, Mahall BA.** (2001). Compensatory growth and competitive ability of and invasive weed are enhanced by soil fungi and native neighbors. *Ecol Lett* 4:1–5.
- Camargo-Ricalde SL, Dhillion SS, Jiménez-González C.** (2003). Mycorrhizal perennials of the “matorral xerófilo” and the “selva baja caducifolia” communities in the semiarid Tehuacán–Cuicatlán Valley, México. *Mycorrhiza* 13:129-136.
- Cantero Gutiérrez A, West MF.** (2007). Proyecto de Resolución N° 3540-D. Promover el incremento de la oferta de especies vegetales no tradicionales productoras de aceites, con el fin de atender la demanda creciente de la producción de biodiesel. Trámite Parlamentario N° 92 (18/07/2007), H. Cámara Diputados de la Nación Argentina.
- Capitanelli RG.** (1979). Clima. En: *Geografía Física de la provincia de Córdoba*, Vazquez J, Miatello R, Roqué M (eds.), Boldt, Buenos Aires, Pp. 45-138.
- Carlquist S.** (1960). Wood anatomy of *Astereae* (*Compositae*). *Tropical Woods* 113: 54- 83.
- Carlquist S.** (1966). Wood Anatomy of *Compositae*: A summary, with comments on factors controlling wood evolution. *Aliso* 6 (2): 25-44.
- Carpinella MC, Ruiz G, Palacios SM.** (2010). Screening of native plants of central Argentina for antifungal activity. *Allelopathy J* 25: 2.
- Castro-Diez P.** (2002). Factores que limitan el crecimiento de la vegetación leñosa mediterránea. Respuestas de las plantas: de órgano a comunidad. En: *La regeneración natural del bosque mediterráneo en la península ibérica*. J. Charco (ed.). ARBA-Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, España, Pp. 47-85.
- Cázares E, Trappe JM, Jumpponen A.** (2005). Mycorrhiza-plant colonization patterns on a subalpine glacier forefront as a model system of primary succession. *Mycorrhiza* 15:405-416.
- Chapin FS III, Moilanen L.** (1991). Nutritional controls over nitrogen and phosphorus resorption from Alaskan birch leaves. *Ecology* 72: 709-715.
- Chapin FS III, Tieszen LL, Lewis M, Miller PC, McCown BH.** (1980). Control of tundra allocation patterns and growth. En: *An arctic ecosystem: The coastal tundra at Barrow, Alaska*. Brown J, Miller P, Tieszen L, Bunnell F. (eds.). Doeden, Hutchinson, Stroudsburg, Pp. 140-185.
- Chapin FS, Bloom AJ, Field CB, Waring RH.** (1987). Plant responses to multiple environmental factors. *BioScience* 37: 49-57.
- Cheeke PR.** (1988). Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. *J Anim Sci* 66: 2343-2350.
- Chon SU, Choi SK, Jung S, Jang HG, Pyo BS, Kim HG.** (2002). Effects of alfalfa leaf extracts and phenolics allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfalfa and barnyard grass. *Crop Prot* 21: 1077-1082.
- Chou CH.** (1999). Role of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. *Critical Rev Plant Sci* 18:609-636.

- Chou CH.** (2006). Allelopathy: a physiological process with ecological implications. En: Reigosa MJ, Pedrol N, Gonzalez L (eds.) Introduction to allelopathy. The Netherlands, Pp. 1-10.
- Cipollini D.** (2004). Stretching the limits of Plasticity: can a plant defend against both competitors and herbivores?. *Ecology* 85:28-37.
- Cipollini DF, Bergelson J.** (2000). Plant density and nutrient availability constrain constitutive and wound-induced expression of trypsin inhibitors in *Brassica napus*. *J Chem Ecol* 27: 593-610.
- Clark DA, Clark DB.** (1987). Temporal and environmental patterns of reproduction in *Zamia skinneri*, a tropical rain forest cycad. *J Ecol* 75: 135–149.
- Cleveland CC, Townsend AR, Schmidt SK, Constance BC.** (2003). Soilmicrobial dynamics and biogeochemistry in tropical forests and pastures, southwestern Costa Rica. *Ecol. Appl.* 13: 314-326.
- Cleveland CC, Townsend AR, Schmidt SK, Constance BC.** (2004). Soil microbial dynamics in Costa Rica: seasonal and biogeochemical constraints. *Biotropica* 36: 184-195.
- Cleveland CC, Townsend AR, Schmidt SK, Constance BC.** (2007). Increases in soil respiration following labile carbon additions linked to rapid shifts in soil microbial community composition. *Biogeochemistry* 82: 229-240.
- Collier SC, Yarnes CT, Herman RP.** (2003). Mycorrhizal dependency of Chihuahuan Desert plants is influenced by life history strategy and root morphology. *J. Arid Environ* 55: 223-229.
- Combrick S, Du Flooy GW, McCrindle RI, Botha M.** (2007). Morphology and histochemistry of the glandular trichomes of *Lippia scaberrima* (*Verbenaceae*). *Ann Bot* 99: 1111-1119.
- Conti ME.** (2000). Principios de Edafología. Con énfasis en suelos argentinos, 2° edición. Ed. Facultad de Agronomía, UBA, Buenos Aires, Argentina. Pp 430.
- Copeland LO, Mc Donald MB.** (1985). Principles of Seed Science and Technology (second edition) (eds.). Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, USA.
- Cornelissen JHC, Cerabolini B, Aerts R, Werger MJA, Van Der Heijen MGA.** (2001). Carbon cycling traits of plant species are linked with mycorrhizal strategy. *Oecologia*, 129: 611-619.
- Cortes-Sarabia J, Pérez-Moreno J, Delgadillo JM, Ferrera-Cerrato R, Ballesteros-Patrón G.** (2009). Seasonality and Rhizosphere Microorganisms of Ilama (*Annona diversifolia* Saff.) in Natural Orchards in the Dry Tropics. *Terra latinoamericana* 27 (1).
- Costa CSB, Armstrong R, Detrés Y, Koch EW, Bertiller M, Beeskow A, Neves LS, Tourn GM, Bianciotto OA, Pinedo LB, Blessio AY, San Roman N.** (2006). Effect of Ultraviolet-B Radiation on Salt Marsh Vegetation: Trends of the Genus *Salicornia* along the Americas. *Photochem Photobiol* 82(4):878-886.
- Cutler HG, Cutler SJ.** (1999). Biologically Active Natural Products: Agrochemical. CRC, Boca Raton, London, NY, Washington.
- D'Ambrogio de Argüeso AC.** (1986). Manual de técnicas en histología vegetal. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- Davis SD, Sperry JS, Hacke UG.** (1999). The relationship between xylem conduit diameter and cavitation caused by freezing. *Am J Bot* 86: 1367-1372.
- Dayan FE, Duke SO.** (2006). Clues in the search for new herbicides En: Reigosa MJ, Pedrol N, Gonzalez L (eds.) Introduction to allelopathy. The Netherlands, Pp. 63-81.
- Dayan FE, Watson SB, Galindo JCG, Hernandez A, Dou J, Mcchesney JD, Duke O.** (1999). Phytotoxicity of quassinoids: physiological responses and structural requirements. *Pest Biochem Physiol* 65: 15-24.
- del Moral R, Muller CH.** (1969). Fog drip: a mechanism of toxin transport from *Eucalyptus camaldulensis*. *Am Midl Nat* 83: 254-282.
- Delbón N, Cosa MT, Dottori N.** (2007). Anatomía de órganos vegetativos en *Flourensia campestris* y *F. oolepis* (*Asteraceae*), con especial referencia a las estructuras secretoras. *Arnaldoa* 14: 61-70.
- Dennis R, Meijaard E, Applegate G, Nasi R, Moore P.** (2001). Impact of human-caused fires on biodiversity and ecosystem functioning, and their causes in tropical, temperate and boreal

- forest biomes. CBD Technical Series No. 5. Montreal, Canadá, Convenio sobre la Diversidad Biológica.
- Desmachelier** C, Coussio J, Ciccía G. (1998). Antioxidant and free radical scavenging effects of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam) DC (“marcela”). *Braz J Med Biol Res* 31: 1163-1170.
- Dewick** PM. (2002). Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 2nd edition, John Wiley and Sons (eds.), Chichester, UK.
- Dhillon** SS, Vidiella PE, Aguilera LE, Friese CF, De León JJ, Armesto JJ, Zak JC. (1995). Mycorrhizal plants and fungi in the fog-free Pacific coastal desert of Chile. *Mycorrhiza* 5: 38-386.
- Diáz** S, Hodgson JG, Thompson K, Cabido M, Cornelissen JHC, Jalili A, Montserrat-Martí G, Grime JP, Zarrinkamar F, Asri Y, Band SR, Basconcelo S, Castro-Díez P, Funes G, Hamzehee B, Khoshnevi M, Pérez-Harguindeguy N, Pérez-Rontomé MC, Shirvany FA, Vendramini F, Yazdani S, Abbas-Azimi R, Bogaard A, Boustani S, Charles M, Dehghan M, de Torres-Espuny L, Falczuk V, Guerrero-Campo J, Hynd A, Jones G, Kowsary E, Kazemi-Saeed F, Maestro-Martínez M, Romo-Díez A, Shaw S, Siavash B, Villar-Salvador P, Zak MR. (2004). The plant traits that drive ecosystems: Evidence from three continents. *J Veg Sci* 15: 295-304.
- Diaz-Napal** GN, Carpinella MC, Palacios SM. (2009). Antifeedant activity of ethanolic extract from *Flourensia oolepis* and isolation of pinocembrin as its active principle compound. *Bioresource Technol* 100: 3669-3673.
- Dillon** MO, Mabry TJ. (1977). Flavonoid aglycones from *Flourensia*. *Phytochemistry* 16: 1318-1319.
- Dillon** MO. (1984). A Systematic study of *Flourensia* (*Asteraceae*, *Heliantheae*). *Fieldiana* 16: 1-27.
- Dornbos** DL, Spencer GF. (1990). Natural Products Phytotoxicity: ABioassay Suitable for Small Quantities of Slightly WaterSoluble Compounds. *J Chem Ecol* 16: 339-352.
- Duke** MV, Paul RN, Elsohly HN, Sturtz G, Duke SO. (1994). Localization of artemisinin and artemisitene in foliar tissues of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua*. *Internat J Plant Sci* 155: 365-373.
- Duke** SO, Canel C, Rimando AM, Tellez MR, Duke MV, Paul RN. (2000). Current and potential exploitation of plant glandular trichome productivity. *Adv Bot Res* 31: 121-151.
- Duke** SO, Dayan F.E. (2006). Modes of action of phytotoxins from plants. En: Reigosa MJ, Pedrol N, González L (eds.), Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications. Springer, The Netherlands, Pp. 511-536.
- Durante** M, Maseda PH, Fernández RJ. (2011). Xylem efficiency vs. safety: Acclimation to drought of seedling root anatomy for six Patagonian shrub species. *J Arid Environ* 75: 397-402.
- Edelin** C. (1984). L'architecture monopodiale: l'exemple de quelques arbres d'Asie tropicale. Th. Doct. Etat, Univ. Montpellier II, Francia, Pp. 258.
- Edrisi** A, Farahbaksh M. (2011). Germination of Barley as Affected by the Allelopathy of *Sisymbrium irio* L. and *Descurainia sophia* (L.) Schur. *World Acad Sci, Eng Technol* 74: 650-652.
- El Amine Dib** M, Djabou N, Desjobert JM, Allali H, Tabti B, Muselli A, Costa J. (2010). Characterization of volatile compounds of *Daucus crinitus* Desf. Headspace Solid Phase Microextraction as alternative technique to Hydrodistillation. *Chem Central J* 4:2-16
- Ens** EJ, Bremner JB, French K, Korth J. (2009). Identification of volatile compounds released by roots of an invasive plant, bitou bush (*Chrysanthemoides monilifera* spp. *rotundata*), and their inhibition of native seedling growth. *Biol Invasions* 11: 275-287.
- Ercoli** L, Masoni A, Pampana S, Arduini I. (2007). Allelopathic effects of rye, brown mustard and hairy vetch on redroot pigweed, common lambsquarter and knotweed. *Allelopathy J* 19: 249-256.
- Esau** K. (1965). Plant anatomy. John Wiley y Sons, New York.
- Estell** RE, Frederickson EL, Havstad KM. (1996). Chemical composition of *Flourensia cernua* at four growth stages. *Grass Forage Sci* 51: 434-441.

- Estell RE**, Fredrickson EL, Anderson DM, Havstad KM, Remmenga, MD. (1998). Relationship of tarbush leaf surface terpene profile with livestock herbivory. *J Chem Ecol* 24: 1-12.
- Ezawa T**, Smith SE, Smith FA. (2002). P metabolism and transport in AM fungi. *Plant Soil* 244: 221-230.
- Fahn A**, Cutler DF. (1992). Xerophytes. En: *Handbuch der pflanzenanatomie*, Band XIII, Teil 3, Pp. 176.
- Fahn A**. (1988). Secretory tissues in vascular plants. *New Phytol* 108: 229-257.
- Fahn A**. (2000). Structure and function of secretory cells. En: *Plant Trichomes*, Volume 31 (Advances in Botanical Research) J. A. Callow (ed.), 1 st Edition, Pp. 37-66.
- Faini F**, Labbé C, Coll J. (1999). Seasonal changes in the composition of epicuticular waxes from the leaves of *Baccharis linearis*. *Biochem Syst Ecol* 27: 673-679.
- Faini F**, Labbe C, Salgado I, Coll J. (1997). Chemistry, toxicity and antifeedant activity of the resin of *Flourensia thurifera*. *Biochem Syst Ecol* 25: 189-193.
- Fernández J**. (1945). Plantas tintóreas y arte de teñir en la provincia de Santiago del Estero. Feria textil de Villa Atamisqui. Stgo. del Estero, Argentina.
- Ferreira JFS**, Simon JE, Janick J. (1995). Developmental studies of *Artemisia annua*: flowering and artemisinin production under greenhouse and field conditions. *Planta Med.* 61: 167-170.
- Fischer G**, Frohberg K, Keyzer MA, Parikh KS. (1988). *Linked National Models: A Tool for International Food Policy Analysis*. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.
- Fontenla S**, Puntieri J, Ocampo JA. (2001). Mycorrhizal associations in the Patagonian steppe, Argentina. *Plant Soil* 233:13-29.
- Fracchia S**, Aranda A, Gopar A, Silvani V, Fernandez L, Godeas A. (2009). Mycorrhizal status of plant species in the Chaco Serrano Woodland from Central Argentina. *Mycorrhiza* 19: 205-214.
- Fredrickson EL**, Estell RE, Havstad KM, Supe WL, Murray LW. (2000). The effect of feeding ewe lambs a 15% tarbush (*Flourensia cernua* DC) pellet pre- and post-weaning on the subsequent diet selection of tarbush. *J Arid Environ* 44: 123-131.
- Fujii Y**, Hiradate S. (2005). A critical survey of allelochemicals in action: the importance of total activity and the weed suppression equation. En: Harper JD, An M, Wu H, Kent JH (eds.), *Establishing the Scientific Base: Proceedings and Selected Papers of the Fourth World Congress on Allelopathy*. Charles Sturt University, NSW, Australia, Pp. 73-76.
- Fukai T**, Nomura T. (1990). NMR spectra of isoprenoid substituted phenols. Part 3. Structure of 6- or 8-isoprenoid substituted flavanone: Chemical shift of the hydrogen-bonded hydroxyl group. *Heterocycles* 31: 1861-1872.
- Gadgil MD**, Solbrig OT. (1972). The concept of r- and k- selection: evidence from wild flowers and some theoretical considerations. *Am Nat* 106: 14-31.
- Galíndez G**, Biganzoli F, Ortega-Baez P, Scopel AL (2009). Fire responses of three co-occurring Asteraceae shrubs in a temperate savanna of South America). *Plant Ecol* 202 (1): 149-158.
- Gange AC**, Ayres R. (1999). On the relation between arbuscular mycorrhizal colonization and plant "benefit". *Oikos* 87: 615-621.
- García M**, Gonzalez-Coloma A, Donadel OJ, Ardanaz CE, Tonn CE, Sosa ME. (2007). Insecticidal effects of *Flourensia oolepis* Blake (*Asteraceae*) essential oil. *Biochem Syst Ecol* 35, 181-187.
- Gatti AB**, Gui Ferreira A, Arduin M., Gualtieri SC. (2010). Allelopathic effects of aqueous extracts of *Artisotolochia esperanzae* O. Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. *Acta Bot Bras* 24(2): 454-461.
- Genre A**, Bonfante P. (2005). Building a mycorrhizal cell: how to reach compatibility between plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *J Plant Interact* 1: 3-13.
- Gifford RM**, Evans LT. (1981). Photosynthesis, carbon partitioning, and yield. *Annu Rev Plant Phys.* 32: 485-509.
- Giorgis MA**, Cingolani AM, Chiarini F, Chiapella J, Barboza G, Ariza Espinar L, Morero R, Gurvich DE, Tecco PA, Subils R, Cabido M. 2011. Composición florística del Bosque Chaqueño Serrano de la provincia de Córdoba, Argentina. *Kurtziana* 36 (1): 9-43.

- Gitz DC**, Liu-Gitz L. (2003). How do UV photomorphogenic responses confer water stress tolerance?. *Photochem Photobiol* 78:529-534.
- Giuliano DA**. 2001. Clasificación infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). *Darwiniana* 39(1-2): 131-154.
- Gniazdowska A**, Bogatek R. (2005). Allelopathic interaction between plants. Multi site action of allelochemicals. *Acta Physiol Plant* 27: 395-407.
- Goodwin TW**. (1971). Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry. Academic Press, Londres.
- Goto Y**, Kojima Y, Nakayama T, Terazawa M. (2001). Allelopathic sesquiterpenoids from rhizomes of *Petasites japonicus ssp. giganteus* Kitam. *Phytochemistry* 57: 109-113.
- Grace C**, Stribley DP. (1991). A safe procedure for routine staining of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol Res* 95:1160-1162.
- Grayson DH**. (2000). Monoterpenoids. *Nat Prod Rep* 17: 385-419.
- Grover HD**, Musick HB. (1990). Shrubland encroachment in southern New Mexico, U.S.A.: an analysis of desertification processes in the American southwest. *Climatic Change* 17: 305-330.
- Guenoune D**, Galili S, Phillips DA, Volpin H, Chet I, Okon Y, Kapulnik Y. (2001). The defense response elicited by the pathogen *Rhizoctonia solani* is suppressed by colonization of the AM-fungus *Glomus intraradices*. *Plant Sci* 160: 925-932.
- Guerreiro E**, Kavka J, Giordano OS, Gros EG. (1979). Sesquiterpenoids and flavonoids from *F. oolepis*. *Phytochemistry* 18: 1235-1237.
- Hallak AMG**, Davide LC, Gavilanes ML, Souza IF. (1999). Efeito de exsudatos de raiz e sorgo (*Sorghum bicolor* L.) sobre características anatómicas do caule do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ciencia e Agrotecnol* 23: 317-322.
- Hallé F**, Oldeman RAA, Tomlinson PB. (1978). Tropical trees and forests. Springer, Berlín.
- Hallé F**, Oldeman RAA. (1970). Essai sur l'architecture et la dynamique de croissance des arbres tropicaux. Masson, París.
- Hamasaki T**, Sato Y, Hatsuda Y. (1975). Structure of sydownin A, sydownin B, and sydowninol, metabolites from *Aspergillus sydowi*. *Agric Biol Chem* 39: 2341-2345.
- Hamdi BA**, Inderjit C, Olofsdotter M., Streibig, JC. (2001). Laboratory bioassay for hytotoxicity: an example from wheat straw. *Agron J* 93: 43-48.
- Harborne JB**, Baxter H, Moss GP. (1999). *Phytochemical dictionary. A handbook of bioactive compounds*. 2nd revised edition, Taylor y Francis, London.
- Harborne JB**, Williams CA. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 22: 481-504.
- Harborne JB**. (1991). The chemical basis of plant defense. En: *Plant defenses against mammalian herbivory*. R.T. Palo, C.T. Robbins (eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida. Pp. 45-59.
- Harborne JB**. (1997). Role of phenolic secondary metabolites in plants and their degradation in nature. En: Cadisch G, Giller KE (eds.). *Driven by nature. Plant litter quality and decomposition*. CAB International, Pp. 67 - 74.
- Harborne JB**. (1999). The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochem Syst Ecol* 27:335-367.
- Harley JL**, Harley EL. (1987a). A check-list of mycorrhiza in the Bristh flora. *New Phytol* 105: 1-102.
- Harley JL**, Harley EL. (1987b). A check-list of mycorrhiza in the Bristh flora-Addenda, errata and index. *New Phytol* 107: 741-749.
- Harper J L**. (1977). Population biology of plants. Academic Press, London.
- Hartnett DC**, Wilson GWT. (2002). The role of mycorrhizas in plant community structure and dynamics: lessons from grasslands. *Plant Soil* 244: 319-331.
- Hashidoko Y**, Tahara S, Mizutani J. (1991). Novel bisabolanoids in *Rosa rugosa* leaves. *Z. Naturforsch.* 46: 349-356.
- Hashidoko Y**, Urashima M. (1995). Efficient preparation of browning-free glandular trichome tissues from the surface of leaves of *Rosa rugosa* Thunb. *Plant Cell Physiol* 36: 127-132.

- Hess S**, Alvarez JL, Iturra G, Romero M. (2002). Evidence of UVB differential response in *Sophora microphylla* from shady and sunny places. Bol. Soc. Chil Quim 47: 501-510.
- Hirai N**, Sakashita S, Sano T, Inoue T, Ohigashi H, Premasthira C, Asakawa Y, Harada J, Fujii Y. (2000). Allelochemicals of the tropical weed *Sphenoclea zeylanica*. Phytochemistry 55: 131-140.
- Honkanen T**, Haukioja E. (1998). Intraplant regulation and plant/herbivore interactions. Ecoscience 5: 470-479.
- Iganci JRV**, Bobrowski VL, Heiden G, Stein VC, Rocha BHG. (2006). Efeito do extrato aquoso de diferentes especies de boldo sobre a germinacao e indice mitotico de *Allium cepa* L. Arquivos do Inst Biol 73: 79-82.
- INTA Manfredi**. (2003). Los Suelos, Nivel de Reconocimiento 1:500.000. Serie C, Recursos Naturales de la Prov. de Córdoba, Agencia Córdoba DAC y SEM, Dirección Ambiente.
- Isman MB**. (1999). Neem and Related Natural Products. En: Biopesticides: Use and Delivery. Hall FR, Menn JJ (eds.). Humana Totowa, New Jersey, Pp. 139-153.
- Isman MB**. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. Crop Prot 19: 603-608.
- Jackson ML**. (1964). Análisis químico de Suelos. 3ª. Ed. Omega. Barcelona, Pp. 622.
- Jacobi US**, Fleck NG. (2000). Avaliacao do potencial alelopático de genotipos de aveia no inicio do ciclo. Pesqui Agropecu Bras 35: 11-19.
- Jaensch M**, Jakupovic J, King RM, Robinson H. (1989). Pyrones and other constituents from *Podolepis* species. Phytochemistry 28: 3497-3501.
- Javot H**, Pumplin N, Harrison MJ. (2007). Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. Plant Cell Environ 30: 310-322.
- Jefferson PG**, Johnson DA, Asay KH. (1989). Epicuticular wax production, water leaf status and leaf temperature in *Triticaceae* range grasses of contrasting glaucousness. Can J Plant Sci 69: 513-519.
- Judd WS**, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. (2002). Plant Systematics: a phylogenetic approach. Segunda edición. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Juliani HR Jr**, Koroch AR, Juliani HR, Trippi VS, Zygodlo JA. (2002). Intraespecific variation in leaf oils of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. Biochem Syst Ecol 30:163-170.
- Jumpponen A**, Trappe JM. (1998). Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic rootcolonizing fungi. New Phytol 140: 295-310.
- Karabourniotis G**, Kotsabassidis D, Manetas Y. (1995). Trichome density and its protective potential against ultraviolet-B radiation damage during leaf development. Can J Bot 73: 376-383.
- Karabourniotis G**, Papadopulus K, Papmarkou M, Manetas Y. (1992). Ultraviolet-B radiation absorbing capacity of leaf hairs. Physiol Plant 86: 414-418.
- Kato-Noguchi H**. (2001). Effects of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract on germination and seedling growth of six plants. Acta Physiol Plant 23: 49-53.
- Kato-Noguchi H**. (2003a). Allelopathic substances in *Pueraria thunbergiana*. Phytochemistry 63: 577-580.
- Kato-Noguchi H**. (2003b). Isolation and identification of an allelopathic substance in *Pisum sativum*. Phytochemistry 62: 1141-1144.
- Kaworu E**, Wengui Y, Robert HD, Hyoji N, Kazutoshi O. (2001). Variation in the allelopathic effect of rice with water soluble extracts. Agron J 93:12-16.
- Keeley J**. (1992). Recruitment of seedling and vegetative sprouts in unburned chaparral. Ecology 73: 194-1208.
- Keeley JE**, Zedler PH. (1978). Reproduction of chaparral shrubs after fire: a comparison of the sprouting and seed strategies. Am. Midl. Nat. 97:120-132.
- Kellog E**. (2000). A model of inflorescence development. En: Monocots, Systematics and Evolution, vol. 1. Jacobs WL, Everett J.(eds.), Csiro Publishing, Melbourne, Pp. 84-88.
- Kim HK**, Choi YH, Verpoorte R. (2011). NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go?. Trends biotechnol 29:267-75.
- Kliebenstein DJ**. (2004). Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses (review). Plant Cell Environ 27: 675-684.

- Kobaisy M**, Tellez MR, Webber CL, Dayan FE Schrader KK, Wedge DE. (2001). Phytotoxic and fungitoxic activities of the essential oil of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) leaves and its composition. *J Agric Food Chem* 49: 3768-3771.
- Kohli A**, Leech M, Vain P, Laurie DA, Christou P. (1998). Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot-spots. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7203-08.
- Kohli RK**, Singh HP, Batish DR. (2001). *Allelopathy in Agroecosystems*. Haworth Press Inc. NY.
- Koide RT**, Kabir Z. (2000). Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *New Phytol* 148: 511-517.
- König WA**, Hochmuth DH, Joulain D. (2001). *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils*. Library of MassFinder 2.1. University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg.
- Laakso K**, Sullivan JH, Huttunen S. (2000). The effects of UV-B radiation on epidermal anatomy in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) and Scots pine (*P. sylvestris* L.) *Plant Cell Environ* 23: 461-472.
- Lambers H**, Chaping F, Pons TL. (2008). *Plant Physiological Ecology*, New York, Springer-Verlag.
- Lambers H**, Poorter H, Van Vuuren MMI. (1998). Inherent variation in plant growth. Physiological mechanisms and ecological consequences. Backhuys, Leiden.
- Lambers H**, Poorter H. (1992). Inherent variation in growth rate between higher plants: A search for physiological causes and ecological consequences. *Adv Ecol Res* 21: 187-261.
- Lan Ding**, Linlin Qi, Hongwei Jing, Juan Li, Wei Wang, Tao Wang. (2008). Phytotoxic effects of leukamenin E (an ent-kaurene diterpenoid) on root growth and root hair development in *Lactuca sativa* L. seedlings. *J Chem Ecol* 34: 1492-1500.
- Larose G**, Chenevert R, Moutoglis P, Gagne S, Piche Y, Vierheilig H. (2002). Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *J Plant Physiol* 159: 1329-1339.
- Lavorel S**, Díaz S, Cornelissen JHC, Garnier E, Harrison SP. (2007). Plant functional types: are we getting any closer to the Holy Grail?. En: J Cabadell, Pitelka LF, Pataki D (eds.). *Terrestrial Ecosystems in a Changing World*. Springer-Verlag, NY. Pp. 171-186.
- Lee IK**, Monsi M. (1963). Ecological studies on *Pinus densiflora* forest. Effects of plant substances on the floristic composition of the undergrowth. *Bot Mag* 76: 400-413.
- Levins R**. (1968). *Evolution in changing environments: some theoretical explorations*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Li HY**, Smith SE, Holloway RE, Zhu YG, Smith FA. (2006). Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi contribute to phosphorus uptake by wheat grown in a phosphorusfixing soil even in the absence of positive growth responses. *New Phytol* 172: 536-543.
- Li S-C**, Gish G, Yang D, Coffey AJ, Forman-Kay JD, Ernberg I, Kay LE, Pawson T. (1999). Novel mode of ligand binding by the SH2 domain of the human XLP disease gene product SAP/SH2D1A. *Curr Biol* 9: 1355-1362.
- Lima VF**, Pereira GA, Menezes NL de. (2009). Morpho-anatomical analysis of the rhizome in species of *Scleria* Berg. (*Cyperaceae*) from Serra do Cipó (MG). *Braz Arch Biol Technol* 52(6):1473-1483.
- Loreto F**. (2002). Distribution of isoprenoid emitters in the genus around the world: chemotaxonomical implications and evolutionary considerations based on the ecological function of the trait. *Perspect Plant Ecol Evo Syst* 5 (3): 185-192 Online publication date: 1-Jan-2002.
- Lotina-Hennsen B**, King-Diaz B, Aguilar MI, Hernandez Terrones MG. (2006). Plant secondary metabolites. Targets and mechanisms of allelopathy. En: Reigosa MJ, Pedrol N, González L (eds.), *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications*, The Netherlands. Pp. 229-265.

- Lugo M**, Cabello M. (2002). Native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from mountain grassland (Córdoba, Argentina) I. Seasonal variation of fungal spore diversity. *Mycologia* 94: 579-586.
- Luoma DL**, Amaranthus M, Trappe J. (1996). Community structure and dynamics of ectomycorrhizal fungi in forest stands: A study plan for demonstration of ecosystem management options (DEMO) sites. Oregon State University
- Luti R**, Bertran de Solís M; Galera F, Muller de Ferreira N, Berzal M, Nores M, Herrera M, Barrera J. (1979). Vegetación. Geografía Física de la Provincia de Córdoba. Vazquez J, Miatelo R, Roque M (eds.). Editorial Boldt, Buenos Aires, Pp. 297-368.
- Barrera MD**, Rivera SM. 1993. El xilopodio de *Eupatorium buniifolium* (Hooker and Arnott) y su respuesta después del fuego. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata* 69: 13-22
- Lydon J**, Duke SO. (1993). The role of pesticides on host allelopathy and their effects on allelopathic compounds. En: *Pesticide Interactions in Crop Production. Beneficial and Deleterious Effects* Altman J (ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, Pp. 37-56.
- Macías FA**, Galindo JCG, Molinillo JMG, Horace GC. (1999). *Advances in Allelopathy. Vol. I. A Science for the Future*, International Allelopathy Society, Servicio de Publicaciones Universidad de Cadiz, España.
- Macías FA**, Simonet AM, Galindo JCG. (1997). Bioactive steroids and triterpenes from *Melilotus messanesis* and their allelopathic potential. *J Chem Ecol* 23: 1781-1803.
- Macías FA**, Varela RM, Torres A, Oliva RM, Molinillo JMG. (1998). Bioactive norsesquiterpenes from *Helianthus annuus* with potential allelopathic activity. *Phytochemistry* 48: 631-636.
- Mancini E**, Arnold NA, De Martino L, De Feo V, Formisano C, Rigano D, Senatore F. (2009). Chemical composition and phytotoxic effects of essential oils of *Salvia hierosolymitana* Boiss. and *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplicifolia* Boiss. growing wild in Lebanon. *Molecules* 14: 4725-4736.
- Mandyam K**, Jumpponen A. (2005). Seeking the elusive function of the root colonizing dark septate endophytic fungi. *Stud Mycol* 53:173-189.
- Marengo E**, Baiocchi C, Gennaro MC, Bertolo PL. (1991). Chemometrics and intelligent. *Lab Systems* 11: 75-88.
- Marulanda A**, Porcel R, Barea J, Azcón R. (2007). Drought tolerance and antioxidant activities in lavender plants colonized by native drought-tolerant or drought-sensitive *Glomus* species. *Microbial Ecology* 54:543-552.
- Mata R**, Bye R, Linares E, Macías M, Rivero-Cruz I, Pérez O, Timmermann BN. (2003). Phytotoxic compounds from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry* 64: 285-291.
- Matsui M**, Tashiro T, Sasaki M, Takikawa H. (2010). Concise synthesis of an antifeedant sesquiterpene against *Locusta migratoria*. *Biosci Biothech Biochem* 74: 683-684.
- Mazza CA**, Boccacandro H, Giordano CV, Battista D, Scopel AL, Ballaré CL. (2000). Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant Physiol* 122:117-125.
- Mc Auliffe JR**, Hamerlynck EP, Eppes M. (2007). Repeated geologic perturbations and long-lived creosotebush in the Mojave Desert. *J Arid Environ* 69: 96-126.
- Mc Cormick S**, Robson K, Bohm B. (1986). Flavonoids of *Wyethia angustifolia* and *W. helenioides*. *Phytochemistry* 25: 1723-1726.
- Mc Gonigle TP**, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115: 495-501.
- McGonigle T**, Miller MH, Evans DLG, Fairchild GL, Swan JA. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 115: 495-501.
- Menoyo E**, Becerra AG, Renison D. (2007). Mycorrhizal association in *Polylepis* woodlands of Central Argentina. *Can J Bot* 85: 526-531.
- Metcalf CR**, Chalk L. (1950). *Anatomy of the Dicotyledons. Vol. I. 2°*. Oxford University, London.

- Meusel H, Jäger E, Mörchen G.** (1977). The study of growth-forms of higher plants in relation to application of biocide. *Veg Sci Environ Prot* 71-76.
- Meusel H.** (1939). Die Vegetationsverhältnisse der Gipsberge im Kyffhauser und im südlichen Harzvorland. *Hercynia* 2: 1-372.
- Meusel H.** (1952). Über Wuchsformen, Verbreitung und Phylogenie einiger mediterran-mittel-europäischen Angiospermen-Gattungen. *Flora* 139: 333-393.
- Meusel H.** (1970). Wuchsformenreihen Mediterran-mitteleuropäischer Angiosperm-Taxa. *Feddes Repertorium* 81: 41-59.
- Mikhova B, Duddeck H, Taskova R, Mitova M, Alipieva K.** (2004). Oxygenated bisabolane fucosides from *Carthamus lanatus* L. *Z. Naturforsch* 59: 244-248.
- Milberg P, Andersson L, Thompson K.** (2000). Large-seeded species are less dependent on light for germination than small-seeded ones. *Seed Sci Res* 10: 99-104.
- Mohammad M, Pan W, Kennedy A.** (1998). Seasonal mycorrhiza colonization of winter wheat and its effect on wheat growth under field conditions. *Mycorrhiza* 8: 139-144.
- Molina Massey E.** (1909). Contribución al estudio de los montes de la provincia de Córdoba. Tesis. FAUBA. A. Cantiello, Buenos Aires.
- Molisch H.** (1937). Der Einfluss eine Pflanze auf die andere: Allelopathie. Gustav Fischer, Jena.
- Montenegro G, Ginocchio R.** (1992). Modular interpretation of architecture in shrub species. *An Acad Bras Cien* 65: 189-202.
- Mooney HA.** (1983). Carbon-gaining capacity and allocation patterns of mediterranean-climate plants. En: *Mediterranean-type ecosystems: the role of nutrients*. Kruger FJ, Mitchell DT, Jarvis JUM (eds.). Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. Pp 103-119.
- Moreno JM, Oechel WC.** (1994). Fire intensity as a determinant factor of postfire ecosystem recovery in southern California chaparral. En: *The Role of Fire in Mediterranean Ecosystems*. Ecological Studies. Moreno JM, Oechel WC (eds.). Springer-Verlag, NY. Pp. 26-45.
- Müller-Doblies, Weberling F.** (1984). Über Prolepsis und verwandte Begriffe. *Beitr. Biol. Pflanzen* 59: 121-144.
- Muthukumar T, Senthilkumar M, Rajangam M, Udaiyan K.** (2006). Arbuscular mycorrhizal morphology and dark septate fungal associations in medicinal and aromatic plants of Western Ghats, Southern India. *Mycorrhiza* 17:11-24.
- Nambiar EKS, Fife DN.** (1987). Growth and nutrient retranslocation in needles of radiata pine in relation to nitrogen supply. *Ann. Bot.* 60:147-156.
- Nelson DW, Sommers LE.** (1982). Total carbon, organic carbon and organic matter. En: *Methods of Soil Analysis*. Page AL, Miller DH, Keeney DR (eds.). ASA, SSSA, Madison, Wis. Pp. 539-579.
- Nezhadali A, Zarrabi Shirvan B.** (2010). Separation, identification and determination of volatile compounds of *Ziziphora persica* Bunge using HS-SPME/GC-MS. *Int J Environ Sci Develop* 1: 115-118.
- Nicolson T.** (1975). Evolution of vesicular arbuscular mycorrhizas. En: *Endomycorrhizas*. Sanders F(ed.). Academic Press, London. Pp. 25-33.
- Nugroho LH, Peltenburg-Looman AMG, Verberne MC, Verpoorte R.** (2002). Is accumulation of sesquiterpenoid phytoalexins induced in tobacco plants constitutively producing salicylic acid?. *Plant Sci* 162: 989-993.
- Núñez C, Cantero JJ.** (2000). Las plantas medicinales del sur de la provincia de Córdoba. Edit.de la Fundación Univ. Nacional de Río Cuarto.
- O'Connor PJ, Smith SE, Smith FA.** (2001). Arbuscular mycorrhizas influence diversity and structure in a semi-arid plant community. En: *Diversity and Integration in Mycorrhizas*. Smith SE (ed.). Proceeding 3rd International Conference on Mycorrhizas, Adelaide, South Australia.
- Obeso JR, Grubb PB.** (1993). Fruit maturation in the shrub *Ligustrum vulgare* (Oleacea): lack of defoliation effects. *Oikos* 68: 309-316.
- Obeso JR.** (1993). Does defoliation affect reproductive output in herbaceous perennials and woody plants in different ways?. *Funct Ecol* 7: 150-155.
- Obeso JR.** (2002). The costs of reproduction in plants. *New Phytol* 155: 321-348.

- O'Brien TP, McCully ME.** (1981). The Study of Plant Structure: Principles and Selected Methods. Termarcarphi Pty Ltd., Melbourne, Australia.
- Ogawa K, Takano Y.** (1997). Seasonal courses of CO₂ exchange and carbon balance in fruits of *Cinnamomum camphora*. *Tree Physiol* 17:415–420.
- Palacios SM, Del Corral S, Carpinella MC, Ruiz G.** (2010). Screening for natural inhibitors of germination and seedling growth in native plants from Central Argentina. *Ind Crop Prod* 32: 674-677.
- Palacios SM, Maggi ME, Bazán CM, Carpinella MC, Turco M, Muñoz A, Alonso RA, Nuñez C, Cantero JJ, Defago MT, Ferrayoli CG, Valladare GR.** (2007). Screening of Argentinian plants for pesticide activity. *Fitoterapia* 78: 580-584.
- Parodi L.** (1964). Enciclopedia Argentina de agricultura y jardinería. Segunda Ed. (Rev. M. J. Dimitri), Vol. 2. Acme Agency. Bs. As.
- Parvez SS, Parvez MM, Fujii Y, Gemma H.** (2003). Allelopathic competence of *Tamarindus indica* L. root involved in plant growth regulation. *Plant Growth Regul* 41: 139-148.
- Paz V.** (1928). Flora Santiagueña. Coni, Buenos Aires.
- Peterson RL.** (1992). Adaptation of root structure in relation to biotic and abiotic factors. *Can J Bot* 70: 661–675.
- Piazza L, Silva M, López D, Turco M, González T, Tourn GM, Scopel AL.** (2010). Purificación de un metabolito secundario bioactivo con potente efecto herbicida en extractos acuosos de hojas de *Flourensia campestris* (Asteraceae). IV Reunión Binacional de Ecología. Agosto. Buenos Aires, Argentina.
- Pichersky E, Gershenzon J.** (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr Op Plant Biol* 5: 237-243.
- Pires NM, Souza IRP, Prates HT, Faria TCL, Pereira Filho IA, Magalhaes PC.** (2001). Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. *Rev Bras Fis Veg* 13: 55-65.
- Plenchette C, Fortín JA, Furlan V.** (1983). Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. *Plant Soil* 70: 211-217.
- Ploschuk EL, Windauer L, Ravetta DA.** (2001). Potential value of traits associated with perennial habit in the development of new oil-seed crops for arid lands. A comparison of *Lesquerella fenleri* and *L. mendocina* subjected to water stress. *J Arid Environ* 47: 373-386.
- Ponce MM.** (1986). Morfología ecológica de plantas saxícolas del Cerro del Ventana, Prov. de Bs As. Argentina. *Darwiniana* 27: 237- 271.
- Poorter H, Nagel O.** (2000). The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Aust. J. Plant Physiol* 27: 595–607.
- Powles SB, Shaner DL.** (2001). Herbicide resistance and world grains. Powles SB, Shaner DL (eds.), Boca Raton, FL.
- Powles SB, Holtum JAM.** (1994). Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry. Lewis (eds.), Boca Raton, FL.
- Preston R.** (1999). Can plasticity compensate for architectural constraints on reproduction? Patterns of seed production and carbohydrate translocation in *Perilla frutescens*. *J Ecol* 87: 697-712.
- Priotti ZE, Zygadlo JA, Ariza-Espinar L.** (1997). Essential oils of *Flourensia oolepis* S.L. Blake. *J Essent Oil Res* 9: 345-347.
- Provenza FD, Bowns JE, Urness PJ, Malechek JC, Butcher JE.** (1983). Biological manipulation of blackbrush by goat browsing. *J Range Manage* 36: 513-518.
- Punjani BL, Patel KM, Patel UA.** (2006). Allelopathic influence of *Prosopis cineraria* leaf extracts on germination and seedling growth of rice. *Allelopathy J* 18: 339-344.
- Puntieri JD, Barthélémy D, de Reffye P, Brion C.** (1995). Análisis, modelización y simulación de la arquitectura de las plantas. En: Avances y aplicaciones en la región Andino-Patagónica. Actas de las IV Jornadas Forestales Patagónicas, Tomo II, San Martín de los Andes. Pp. 547-573
- Pyykkö, M.** (1966). The leaf anatomy of east Patagonian xeromorphic plants. *Ann Bot Fenn* 3: 453-622.

- Querejeta** JI, Allen MF, Caravaca F, Roldan A. (2006). Differential modulation of host plant delta ^{13}C and delta ^{18}O by native and nonnative arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid environment. *New Phytol* 169:379-387.
- Ramos-Zapata** JA, Orellana R, Allen EB. (2006). Mycorrhizal dynamics and dependence of *Desmoncus orthacanthos* Martius (Arecaceae), a native palm of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Interciencia* 5: 364-370.
- Rauh** W. (1950). Morphologie der Nutzpflanzen. Hartmann P. (ed.). Leipzig.
- Raunkiaer** C. (1934). The life form of plants and statistical geography. Clarendon Press, Oxford.
- Read** DJ, Pérez-Moreno J. (2003). Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems. A journey towards relevance?. *New Phytol* 157: 475-492.
- Reynolds** T. (1987) Comparative effects of alicyclic compounds and quinones on inhibition of lettuce fruit germination. *Ann Bot* 60: 215-223.
- Rice** EL. (1984). Allelopathy. 2nd ed. Academic Press, New York.
- Riches** CR, Caseley JC, Valverde BE, Down VM. (1996). Resistance of *Echinochloa colona* to ACCase inhibiting herbicides. En: Proc. of the Int. Symposium on Weed and Crop Resistance to Herbicides. de Prado R, Jorrín J, García-Torres L, Marshall G (eds.). University of Córdoba, España. Pp. 14-16
- Rizzini** C. (1965). Estudos experimentais sobre o xilopódio e outros órgãos tuberosos de plantas do Cerrado. *An Acad Brasil Ciênc* 37: 87-113.
- Robinson** H. (1981). A revision of the tribal and subtribal limits of the *Heliantheae* (Asteraceae). *Smithsonian Contributions to Botany* 5: 1-102.
- Rolim** de Almeida LF, Frei F, Mancini E, De Martino L, De Feo V. (2010). Phytotoxic activities of mediterranean essential oils. *Molecules* 15: 4309-4323.
- Romagni** JG, Allen SN, Dayan FE. (2000). Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species. *J Chem Ecol* 26: 303-313.
- Routmet** C, Urcelay C, Díaz S. (2006). Suites of root traits differ between annual and perennial species growing in the field. *New Phytol* 170: 357-368.
- Rua** GH, Weberling F. (1998). Growth form and inflorescence structure of *Paspalum* L. (*Poaceae: Paniceae*): a comparative morphological approach. *Beitr Biol Pflanzen* 69: 363-431.
- Rua** GH. (1999). Inflorescencias. Bases teóricas para su análisis. SAB (eds.).
- Ruiz Leal** A. (1972). Flora popular mendocina. *Deserta* 3: 299. Mendoza. Argentina.
- Safaei-Ghomi** J, Meshkatsada MS. (2010). Nano scale injection for the determination of volatile organic components of *Vitex pseudo-negundo* using various extraction techniques. *Dig J Nanomat Biostruc* 5: 207-213.
- Sagar** A, Khawas EL, Shehata MM. (2005). The allelopathic potentialities of *Acacia nilotica* and *Eucalyptus rostrata* on monocot (*Zea mays* L.) and Dicot (*Phaseolus vulgaris* L.) *Plants Biotech* 4(1): 23-34.
- Sánchez-Moreiras** AM, Coba de la Peña T, Reigosa MJ. (2008). The natural compound benzoxazolin-2(3H)-one selectively retards cell cycle in lettuce root meristems. *Phytochemistry* 69: 2172-2179.
- Scervino** JM, Ponce MA, Erra-Bassells R, Vierheilig H, Ocampo JA, Godeas A. (2005). Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Glomus*. *Mycology Res* 109: 789-94.
- Schulz** H, Baranska M, Belz H, Rösch P, Strehle M, Popp J. (2004). Chemotaxonomic characterisation of essential oil plants by vibrational spectroscopy measurements. *Vib Spectrosc* 35: 81-86.
- Schulze** ED, Schilling K, Nagarajah S. (1983). Carbohydrate partitioning in relation to whole plant production and water use of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Oecologia* 58:169-177.
- Scopel** AL, Ballaré CL, Sánchez RA. (1991). Induction light sensibility in buried weed seeds and its role in the perception of soil cultivations. *Plant Cell Environ* 14: 501-508.
- Scrivanti** LR, Zunino MP, Zygodlo JA. (2003). *Tagetes minuta* and *Schimus areira* essential oils as allelopathic agents. *Biochem Syst Ecol* 31: 563-572.
- Searles** PS, Flint SD, Caldwell MM. (2001). A meta-analysis of plant field studies simulating stratospheric ozone depletion. *Oecologia* 127: 1-10.

- Searles PS, Flint SD, Díaz SB, Rousseaux MC, Ballaré CL, Caldwell MM.** (2002). Plant response to solar ultraviolet-B radiation in a southern South American *Sphagnum* peatland. *J Ecol* 90: 704-713.
- Seckt H.** (1929) Flora cordobensis, Córdoba. Imprenta de la Universidad Nacional Córdoba, Argentina.
- Seigler DS.** (2006). Basic pathways for the origin of allelopathic compounds. En: Allelopathy. A Physiological Process with Ecological Implications. Springer, The Netherlands.
- Sharkey TD, Yeh S.** (2001). Isoprene emission from plants. *Ann Rev Plant Phys* 52:407-436.
- Shaver GR, Chapin FS III, Billings WD.** (1979). Ecotypic differentiation in *Carex aquatilis* as related to icewedge polygonization in the Alaskan coastal tundra. *J Ecol* 67:1025-1046.
- Silva M, Piazza LA, López D, López Rivilli MJ, Turco M, Cantero JJ, Tourn GM, Scopel AL.** (2012). Phytotoxic activity in *Flourensia campestris* and isolation of (-)-hamanasic acid A as its active principle compound. *Phytochemistry* 77:140-8.
- Siqueira JO, Carneiro Carbone MA, Curi N, Rosado Da Silva SC, Davide AC.** (1998). Mycorrhizal colonization and mycotrophic growth of native woody species as related to successional groups in Southeastern Brazil. *Forest Ecol Manag* 107: 241-252.
- Siqueira JO, Saggin-Junior OJ.** (2001). Dependency on arbuscular mycorrhizal fungi and responsiveness of some Brazilian native woody species. *Mycorrhiza* 11: 245-255.
- Smith PM.** (1976). The chemotaxonomy of Plants. Edward Arnold, London
- Smith SE, Read DJ.** (1997). Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, Cambridge.
- Smith SE, Read DJ.** (2008). Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, San Diego USA.
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I.** (2004). Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytol* 162: 511-524.
- Soares ACF, Martins MA, Mathias L, Simone Mendonça Freitas M.** (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi and the occurrence of flavonoids in roots of passion fruit seedlings. *Sci Agric* 62 (4): 331-336.
- Solbrig OT, Medina ME, Silva JF.** (1996). Biodiversity and Savanna Ecosystem Processes, A Global Perspective. Ecological Studies. Springer, The Netherlands.
- Sperry JS.** (1995). Limitations on stem water transport and their consequences. En: Plant Stems. Physiology and functional morphology. Gartner BL (ed.). Academic Press, San Diego.
- Stapleton AE, Walbot V.** (1994). Flavonoids protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiol* 105: 881-889.
- Staudt M, Ennajah A, Mouillot F, Joffre R.** (2008). Do volatile organic compound emissions of Tunisian cork oak populations originating from contrasting climatic conditions differ in their responses to summer drought?. *Can J For Res* 38: 2965-2975.
- Staudt M, Mandl N, Joffre R, Rambal S.** (2001). Intraspecific variability of monoterpene composition emitted by *Quercus ilex* leaves. *Can J For Res* 31:174-180.
- Steufer JF, de Kroon H, During HJ.** (1996). Exploitation of environmental heterogeneity by spatial division of labour in a clonal plant. *Funct Ecol* 10: 228-334.
- Sulborska A.** 2007. Distribution and structure of internal secretory reservoirs on the vegetative organs of *Inula helenium* L. (*Asteraceae*). *Acta agrobotanica* 60: 1-12.
- Taiz L, Zeiger E.** (2006). Secondary Metabolites and Plant Defense. En: Plant Physiology. Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc, Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- Tanrisever N, Fronczek FR, Fischer NH, Williamson GB.** (1987). Ceratiolin and other flavonoids from *Ceratiola ericoides*. *Phytochemistry* 26:175-179.
- Tellez M, Estell R, Fredrickson E, Powell J, Wedge D, Schrader K, Kobaisy M.** (2001). Extracts of *Flourensia cernua* (L): volatile constituents and antifungal, antialgal, and antitermite bioactivities. *J Chem Ecol* 27: 2263-2285.
- Tetley U.** (1925). The secretory system of the roots of the *Compositae*. *New Phytol* 24: 138-161.
- Thomas DS, Sansun Y.** (2001). Isoprene emission from plants. *Ann Rev Plant Phys* 52: 407-436.

- Tomlinson** PB. (1978). Branching and axis differentiation in tropical trees. En: F. Hallé et al. (eds.). *Tropical Trees and Forests: an architectural analysis*. Springer, Berlín. Pp. 187-207.
- Tortorelli** LA. (1956). *Maderas y bosques argentinos*. Acme. Bs. As. Pp. vii-xxvii.
- Tourn** GM, Barthélémy D, Gossfeld J. (1999). Una aproximación a la arquitectura vegetal. *Bol Soc Argent Bot* 34: 85-99.
- Troll** W, Weberling F. (1989). *Infloreszenzuntersuchungen an monotelen Familien Materialien zur Infloreszenzmorphologie*. G. Fischer, Stuttgart.
- Troll** W. (1948). *Vergleichende Morphologie der höheren Pflanzen*. Borntraeger, Berlín.
- Tuomi** J, Nilsson D, Åmström M. (1994). Plant compensatory responses: bud dormancy as an adaptation to herbivory. *Ecology* 75: 1429-1436.
- Uriburu** ML, De la Fuente JR, Palermo J, Gil RR, Sosa VE. (2004). Constituents of two *Flourensia* species. *Phytochemistry* 65: 2039-2043.
- Uriburu** ML, De la Fuente JR, Palermo J, Sosa VE. (2005). A chlorinated dihydrobenzofuran from *Flourensia riparia*. *J Argent Chem Soc* 93: 161-164.
- Uriburu** ML, Gil RR, Sosa VE, De la Fuente JR. (2007). Prenylflavonoids from *Flourensia fiebrigii*. *Phytochemistry* 68: 1295-1299.
- Uriburu** ML. (2002). PhD Tesis. Estudio químico y de actividad biológica de especies de *Flourensia*. Biblioteca Facultad de Cs. Exactas, Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina.
- Urzúa** A. (2004). Mono- and sesquiterpenes in the trichome secreted exudates from *Pseudognaphalium cheiranthifolium*, *P. heterotrichium*, *P. vira vira* and *P. robustum*. *Biochem Syst Ecol* 32: 211-214.
- Valderrábano** J, Uriarte J, Muñoz F. (1986). Voluntary intake, health and performance of lactating ewes fed on turnips with or without straw supplement. *Anim Prod* 42: 241-246.
- Van der Heijden** MGA, Boller T, Wiemken A, Sanders, IR. (1998b). Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology* 79: 2082-2091.
- Van der Heijden** MGA. (2004). Arbuscular mycorrhizal fungi as support systems for seedling establishment in grassland. *Ecol Lett* 7: 293-303.
- Van der Heijden**, Klironomos MGA, Ursic JN, Moutoglis M, Streitwolf-Engel P, Boller T, Wiemken A, Sanders IR. (1998a). Mycorrhizal fungal diversity determines plant diversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72.
- Van Soest** PJ. (1987). Plant defensive chemicals. En: *Nutritional Ecology of the ruminant*. Van Soest PJ (ed.). Cornell University Press, Ithaca, NY. Pp. 196-212.
- Väre** H, Vestberg M, EuroIa S. (1992). Mycorrhiza and root-associated fungi in Spitsbergen. *Mycorrhiza* 1: 93-104.
- Verdeguer** M, Blázquez MA, Boira H. (2009). Phytotoxic effects of *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eriocephalus africanus* essential oils in weeds of Mediterranean summer crops. *Biochem Syst Ecol* 37: 362-369.
- Verpoorte** R, Choi YH, Kim HK. (2010). Metabolomics: will it stay?. *Phytochem Analysis* 21: 2-31
- Verzino** G, Joseau J, Dorado M, Gellert E, Rodríguez Reartes S, Nóbile R. 2005. Impacto de los incendios sobre la diversidad vegetal, Sierras de Córdoba, Argentina. *Ecol Apl* 4(1): 25-34.
- Viator** RP, Johnson RM, Grimm CC, Richard EP. (2006). Allelopathic, autotoxic, and hormetic effects of postharvest sugarcane residue. *Agron J* 98: 1526-1531.
- Vierheilig** H. (2004). Further root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in already mycorrhizal plants is suppressed after a critical level of root colonization. *J Plant Physiol* 161: 339-341.
- Vierstra** RD, John TR, Peff KL. (1982). Kaempferol 3-*o*-galactoside, 7-*o*-rhamnoside is the major green fluorescing compound in the epidermis of *Vicia faba*. *Plant Physiol* 69: 522-525.
- Vogelmann** TC. (1993). Plant tissue optics. *Annu Rev Plant Phys* 44: 231-251.
- Vokou** D, Douvli P, Blionis GJ, Halley JM. (2003). Effects of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent seedling growth. *J Chem Ecol* 29: 2281-2301.

- Vyvyan JR.** (2002). Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* 58: 1631-1646.
- Wagner GJ, Wang E, Shepherd RW.** (2004). New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Ann Bot* 93: 3-11.
- Weberling F, Müller-Doblies U, Müller-Doblies D, Rua GH.** (1997). Hacia una terminología descriptiva y morfológico-comparativa para inflorescencias complejas. *Bol Soc Argent Bot* 32: 171-184.
- Weberling F.** (1985). Aspectos modernos de la morfología de las inflorescencias. *Bol Soc Argent Bot* 24: 1-28.
- Weidenhamer JD, Macias FA, Fischer NH, Williamson B.** (1993). Just how insoluble are monoterpenes?. *J Chem Ecol* 19: 1799-1807.
- Weston LA, Inderjit.** (2007). Allelopathy: A Potential Tool in the Development of Strategies for Biorational Weed Management. En: *Non-chemical Weed Management*. Upadhyaya MK, Blackshaw RE (eds.). CAB International. Pp. 65-76.
- Weston LA.** (2005). History and current trends in the use of allelopathy for weed management. En: *Allelopathy: Establishing the Scientific Base*. Harper JD, An M, Wu H, Kent JH. (eds.). Proceedings of the 4th World Congress on Allelopathy. Wagga Wagga, Australia. Pp. 15-21.
- White J.** (1979). The plant as a metapopulation. *Ann Rev Ecol Syst* 10: 109-145.
- White J.** (1984) Plant metamerism. En: *Perspectives on plant population ecology*. Dirzo R., Sarukán J (eds.). Sinauer Associates, Massachusetts. Pp. 15-47.
- Wild A.** (1989). Russell's soil condition and plant grow. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. Edición Española.
- Wilson MF, Burley N.** (1983). *Mata choice in plants*. Princeton, New Jersey.
- Wolfe BE, Weishampel PA, Klironomos JN.** (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi and water table affect wetland plant community composition. *J Ecol* 94: 905-914.
- Wu JHP, Balbi A, Borrill J, Ferreira PG, Hanany S, Jaffe AH, Lee AT, Oh S, Rabii B, Richards PL, Smoot GF, Stompor R, Winant CD.** Asymmetric Beams in Cosmic Microwave Background Anisotropy Experiments. *Ap. J. Sup.* 132:1-17
- Zdero C, Bohlmann F.** (1989). Sesquiterpene lactones from *Oldenburgia arbuscula* and *Pleiotaxis rugosa*. *Phytochemistry* 28: 3345-3346.
- Zedler PH, Gautier CR, McMaster GS.** (1983). Vegetation change in response to extreme events: The effect of a short interval between fires in California chaparral and coastal scrub. *Ecology* 64: 809-818.
- Zhang Y, Li T, Li L, Zhao Z.** (2011). The colonization of plants by dark septate endophytes (DSE) in the valley-type savanna of Yunnan, southwest China. *Afr J Microbiol Res* 5: 5540-5547.
- Zygodlo JA, Maestri DM, Lamarque AL, Guzmán CA, Velasco-Neguerulea A, Pérez-Alonso MJ, García-Vallejos MC, Grosso NR.** (1996). Essential oil variability of *Mintostachys verticillata*. *Biochem Syst Ecol* 24: 319-323.

APÉNDICE I

Caracterización físico-química y textural de los suelos

Los suelos del **Río Pintos, El Dragón, Frente al dique “El Cajón” y “Los Terrones”** son de pH cercanos a la neutralidad, ni sódicos ni salinos, y tienen una clara tendencia hacia la textura gruesa que ocupa entre 64-82 % del total. A priori, estos valores de textura indicarían una insuficiente fertilidad para el crecimiento vegetal. Es así que la CIC varía entre solo 11-13 cmol_c/kg , mientras que suelos con cierta fertilidad alcanzan valores de 15-20 o más (Conti 2000). Sin embargo, por tratarse de textura gruesa, los niveles de C, N, MO y aún la relación C/N, resultan aceptables y aún comparables con suelos de pasturas y de mayor fertilidad (Wild 1989, Conti 2000).

IDENTIFICACION:	Río Pintos	Camino a los “Los Terrones”	Frente al dique “El Cajon” y “El Dragón”
PROFUNDIDAD (cm.)	0-20	0-20	0-11
pH en H₂O (1:2,5)	7,38	7,03	6,00
CONDUCT. EXT.SAT. (dS/m)	0,87	0,52	S/D
T.S.D. EXT.SAT.(mg/l)	558,08	335,36	S/D
MATERIA ORGANICA (%)	3,71	3,75	4,10
CARBONO (%)	2,15	2,18	2,40
NITROGENO TOTAL (%)	0,221	0,225	0,22
RELACION C/N	9,74	9,67	10,90
CATIONES DE INTERCAMB. (cmol_c/kg)	CALCIO	8,80	8,00
	MAGNESIO	1,70	1,40
	SODIO	0,05	0,05
	POTASIO	0,70	0,73
H.DE CAMBIO (meq/100g)	0,46	0,97	1,50
C.I.C. (cmol_c/kg)	11,71	11,15	13,8
SATURACIÓN DE BASE (%)	96,07	91,30	89,00
CONTENIDO DE CARBONATOS	ALTO	MEDIO	0,00
P.S.I. (%)	0,43	0,45	S/D

Tabla I.1. Análisis físico-químicos de los suelos de “Río Pintos”, camino a “Los Terrones”, frente al dique “El Cajón” y “El Dragón” (Depto. Punilla, Córdoba).

IDENTIFICACION:		"Río Pintos"	"El Dragón"	Camino a "Los Terrones"	Frente dique "El Cajón"
TEXTURA (%)	ARCILLA (2 μ)	5,50	8,20	10,60	12,10
	LIMO FINO (2-20 μ)	5,50	6,40	5,60	-
	LIMO GRUESO (20-50 μ)	6,60	9,50	16,60	22,00
	ARENA MUY FINA (50-100 μ)	10,30	8,30	8,90	12,28
	ARENA FINA (100-250 μ)	25,80	26,60	13,10	34,0
	ARENA MEDIA (250-500 μ)	23,30	15,10	12,40	12,60
	ARENA GRUESA (500-1000 μ)	16,70	10,80	19,60	3,90
	ARENA MUY GRUESA (1000-2000 μ)	5,90	13,10	13,30	1,10
TOTAL ARENA (%)		82,00	73,9	67,30	63,88
TOTAL LIMO (%)		12,10	15,90	22,20	22,00
CLASIFICACIÓN TEXTURAL		ARENOSA FRANCA	ARENOSA FRANCA	FRANCO ARENOSA	FRANCO ARENOSA

Tabla I.2. Textura de los suelos de "Río Pintos", "El Dragón", camino a "Los Terrones" y frente al dique "El Cajón" (Depto. Punilla, Córdoba).