



Caracterización Citogenética y  
Contenido de ADN  
de especies nativas de Marcelas  
(*Achyrocline*; Asteraceae)

Magdalena Rodríguez Percopo

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**Licenciatura en Ciencias Biológicas**  
**Orientación Genética y Evolución**

**Caracterización citogenética y Contenido de ADN**  
**de especies nativas de Marcelas**  
**(*Achyrocline*; Asteraceae)**

**Magdalena Rodríguez Percopo**



**Orientadora: Dra. Cristina Mazzella**  
**Laboratorio de Genética**  
**Departamento de Biología Vegetal**  
**FACULTAD DE AGRONOMIA**  
**Montevideo, URUGUAY**

**2009**

# AGRADECIMIENTOS

---

- Al Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Agronomía, por darme la oportunidad de realizar este trabajo.
- A la Dra. Lic. Cristina Mazzella, por su orientación y enseñanzas.
- A Magdalena Vaio y Paola Gaiero, por la ayuda que me brindaron cada vez que lo necesité.
- A todos los compañeros del Laboratorio, por la buena onda de siempre, lo que hizo muy ameno el trabajo.
- A todos los docentes y funcionarios que me acompañaron en diversos momentos.
- A mi familia, amigos, y muy especialmente a Matías, por apoyarme siempre.
- Al los miembros del tribunal, Ing. Agr. Ph D. Pablo Speranza (Facultad de Agronomía, UdelaR), Dr. Lic. Francisco Panzera (Facultad de Ciencias, UdelaR) y Dra. Lic. Cristina Mazzella (Facultad de Agronomía, UdelaR), por la dedicada evaluación y las excelentes sugerencias.

## RESUMEN

---

En Uruguay existen tres especies de marcela pertenecientes al género *Achyrocline* taxonómicamente identificadas como *A. satureioides*, *A. flaccida* y *A. alata*, y tres variantes fenológicas denominadas *A. sp.* “de la piedra”, *A. sp.* “de hoja fina” y *A. sp.* “costera”, esta última determinada recientemente como *A. crassiuscula*.

Al no haber estudios genéticos del germoplasma nativo, el objetivo de este trabajo fue realizar la caracterización cromosómica mediante tinción con orceína y con CMA/DAPI, así como el estudio comparativo del contenido nuclear de ADN de ejemplares pertenecientes a *A. satureioides*, *A. flaccida*, *A. alata* y los biotipos *A. sp.* “de la piedra” y *A. sp.* “costera” del Uruguay.

Con las técnicas de citogenética empleadas se encontró que las cinco entidades presentan un número cromosómico somático de  $2n = 2x = 28$ . Los cariotipos muestran una estructura en gradiente de fórmula cromosómica de 9 metacéntricos y 5 submetacéntricos. Tras la contratinción con CMA/DAPI se observa una banda CMA3 positiva y DAPI negativa en la región pericentromérica del par cromosómico 10 que es metacéntrico. Dicha región, coincide con una región heteropicnótica negativa luego de la tinción con orceína de inequívoca identificación. Sólo el contenido de ADN nuclear permite distinguir a *A. alata* ( $2C = 6,033$  pg) del grupo conformado por *A. satureioides*, *A. flaccida*, *A. sp.* “de la piedra” y *A. sp.* “costera” ( $2C = 5,711$  pg). La gran homogeneidad detectada entre los cinco materiales permite suponer que tienen un origen reciente.

# ÍNDICE

---

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Por qué estudiar las marcelas en Uruguay.....	2
1.2 Familia Asteraceae .....	4
1.3 Género <i>Achyrocline</i> .....	6
1.4 Especies nativas de marcelas .....	7
1.4.1 <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC.....	7
1.4.2 <i>Achyrocline flaccida</i> (Weinm.) DC.....	8
1.4.3 <i>Achyrocline alata</i> (HBK.) DC .....	9
1.4.4 Biotipos de <i>Achyrocline</i> .....	11
1.5 Estudio de las propiedades aromáticas y medicinales de las marcelas .....	13
1.6 Estudios citogenéticos .....	15
2. OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS. HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1 Materiales .....	19
3.2 Métodos .....	23
3.2.1 Obtención de raíces para preparados citológicos .....	23
3.2.1.1 Germinación de semillas .....	23
3.2.1.2 Extracción de raíz de plantas de invernáculo .....	25
3.2.2 Pretratamiento de los meristemas radiculares .....	25
3.2.3 Obtención de preparados citológicos .....	26
3.2.4 Tinción del preparado con orceína lacto-propiónica .....	27
3.2.5 Número Cromosómico y Cariotipo.....	27
3.2.6 Tinción del preparado con CMA3/DAPI .....	29
3.2.7 Observación y fotografía.....	30
3.2.8 Análisis de Contenido de ADN .....	31

4. RESULTADOS.....	33
4.1 Obtención de preparaciones citológicas.....	34
4.2 Número cromosómico y cariotipo .....	36
4.3 Análisis comparativo por bandeo con CMA3/DAPI .....	41
4.4 Contenido de ADN.....	43
5. DISCUSIÓN .....	44
5.1 Conservación de los cariotipos en las marcelas .....	45
5.2 Regiones heterocromáticas y de cistrones ribosomales.....	47
5.3 Distinción de especies por contenido de ADN.....	49
5.4 Variación en la germinación .....	51
6. CONCLUSIONES.....	53
7. BIBLIOGRAFÍA .....	54
8. ANEXOS .....	60

# **1. INTRODUCCIÓN**

---

## 1.1 Por qué estudiar las marcelas en Uruguay

Las marcelas son plantas de uso medicinal y aromático comúnmente consumidas por la población uruguaya. Las plantas medicinales son utilizadas desde la prehistoria como una fuente de drogas para el tratamiento de afecciones. En la actualidad, estas especies han sido revalorizadas como fuente de compuestos activos por parte de la industria farmacológica, por lo que su estudio se encuentra en activa expansión. A su vez, se ha constatado un aumento en el consumo directo de estas plantas por parte de la población como una forma de medicina alternativa, ya sea por cosecha individual de especies silvestres, por medio de cultivos familiares, o adquiriéndolos a través de herboristerías o supermercados. Si bien estas especies son utilizadas tradicionalmente, es necesario conocer el principio activo responsable de la acción terapéutica, así como descartar la presencia de toxicidad, para realizar un uso responsable de las mismas (1, 2).

A pesar de que las plantas medicinales constituyen un recurso invaluable que debe ser conservado, en Uruguay aún no se han desarrollado mecanismos para su control. A los efectos de su conservación se debe conocer qué especies se encuentran presentes en el territorio nacional, tener información sobre la biología de las mismas, sobre su distribución y variabilidad genética. Será necesario asimismo determinar áreas protegidas, y evitar la recolección masiva de poblaciones naturales para disminuir así la erosión genética, razón por la cual estudios sobre domesticación y mejoramiento de estas especies son de mucha utilidad. De la misma forma es fundamental, y aún no resuelto en nuestro país, el control del consumo directo por parte de la

población, ya que justamente son una fuente de drogas. Es necesario además, establecer estándares de producción y normas de calidad que aseguren la correcta identificación de la especie, de la parte anatómica utilizada (hojas, tallo, raíz, flores) y del estadio de desarrollo, ya que generalmente las proporciones e incluso los propios compuestos activos cambian según estas variables (3, 4).

La marcela se consume bajo forma de infusión o de té. En la región se utilizan las inflorescencias y tallos florales de varias especies popularmente conocidas como marcela, que se consumen indistintamente como digestivas, antiespasmódicas, carminativas, colagogas, eupépticas, emenagogas, antidiarreicas, contra infecciones intestinales, febrífugas, hepatoprotectoras y como sedante (5, 6, 4). En Uruguay, dentro de lo que vulgarmente se conoce y consume como marcela, se encuentran al menos tres especies taxonómicamente bien identificadas pertenecientes al género *Achyrocline* de la familia Asteraceae: *A. satureioides* (Lam.) DC. conocida como marcela blanca, *A. flaccida* (Weinm.) DC. o marcela amarilla y *A. alata* (H.B.K.) DC. Además, en la naturaleza se observan diversas variantes morfológicas aun sin clasificación taxonómica formal, que también son consumidas como marcela. Estas variantes, que se denominarán biotipos, son *A. sp.* “de la piedra”, *A. sp.* “costera” y *A. sp.* “de hoja fina, y podrían tratarse de especies nuevas para Uruguay, o ser variantes fenotípicas de las conocidas que tuvieran elevada plasticidad, o incluso tratarse de hibridaciones ínterespecíficas.

A su vez, en un trabajo realizado en Argentina con muestras de herboristerías de ese país, se pudo identificar contaminación en material a la venta de *Achyrocline satureioides* con *Gnaphalium*

*gaudichaudianum*. Esto se debe a la gran semejanza entre las dos especies, lo que escapa ante los ojos de colectores inexpertos, y a la ausencia de controles de calidad, de manera que en ocasiones lo que indica la etiqueta del producto no coincide con lo que se está consumiendo (6). Si bien no hay datos al respecto para Uruguay, la única fuente de marcela para las herboristerías son las poblaciones naturales (R. Lerena, com. pers.), que son cosechadas por colectores locales, lo que hace suponer que puede existir una situación similar a la mencionada anteriormente para Argentina. Por otro lado, la colecta masiva y muchas veces la extracción de la planta entera, tanto por parte de recolectores profesionales como de uso personal, ha contribuido a la disminución poblacional de *A. satureioides* de las zonas de la costa del Uruguay (4). Para las otras especies podría darse la misma situación pero no se tienen datos.

## 1.2 Familia Asteraceae

Las marcelas pertenecen a una familia cosmopolita del grupo de las Angiospermas denominada Asteraceae (también llamada Compositae). Esta familia, que es monofilética, reúne cerca de 23.000 especies agrupadas en 1.535 géneros, por lo que es la familia de Angiospermas con mayor riqueza y diversidad biológica (7). Los miembros de esta familia son mayoritariamente especies herbáceas alógamas, aunque la autofecundación no está excluida. Presentan la característica particular de que la inflorescencia, que es un capítulo, es muy similar a una flor simple actinomorfa, lo que ocasiona que el vulgo confunda involucre con cáliz, flores marginales linguladas con pétalos y flores del disco con piezas sexuales. A su vez, estas especies tienen una capacidad de adaptación y difusión notable, y en la

actualidad se detectan procesos de hibridación, cambios cromosómicos y apomixis, que generan un gran polimorfismo natural, lo que dificulta su clasificación taxonómica. La gran importancia económica de esta familia se debe a el uso de diversas especies como plantas aromáticas, medicinales, insecticidas, ornamentales, siendo escasas aunque importantes las de uso agrícola. Además existen muchas especies invasoras, de bajo o nulo valor forrajero e incluso hay especies tóxicas (5).

Actualmente la familia se subdivide en tres subfamilias, Barnadesioideae, Cichorioideae y Asteroideae. A esta última pertenece el género *Achyrocline*. Las relaciones filogenéticas entre los integrantes de la familia es un tema de revisión actual (9, 10, 11, 12, 13). En la Figura 1 se muestra la filogenia de la familia Asteraceae realizada en base a la recopilación de trabajos de diversos autores (12).

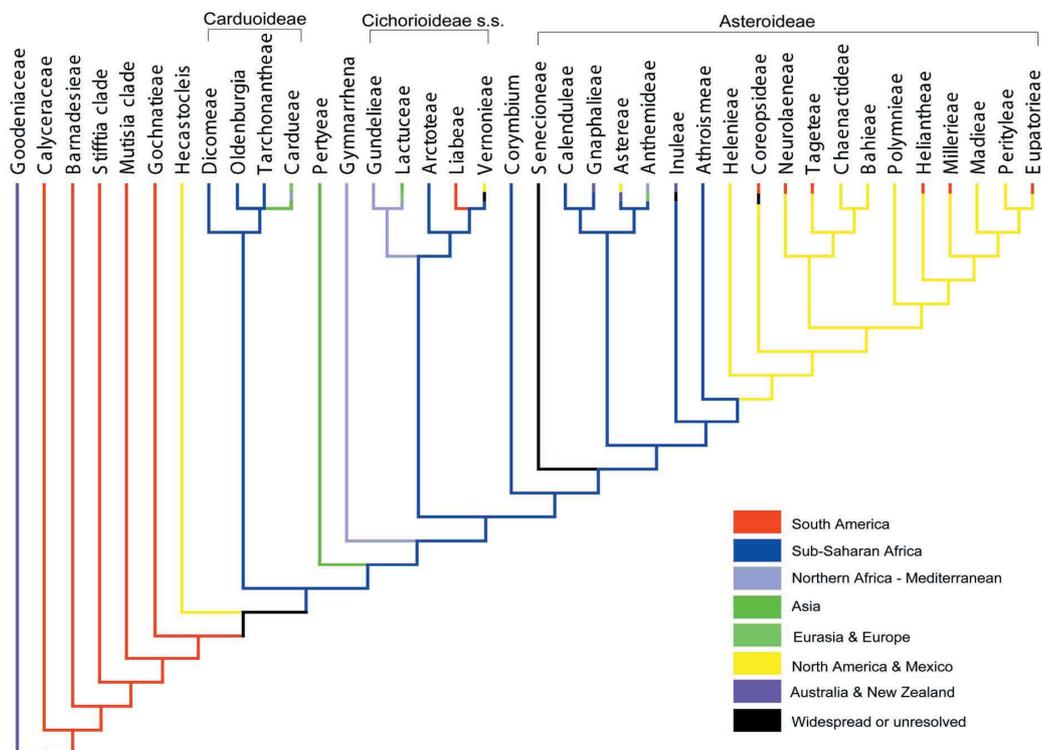


FIGURA 1: Súper árbol que muestra las relaciones filogenéticas de la familia Asteraceae, extraído de Funk *et al.* (2005) (12). Los colores representan los centros de origen.

### 1.3 Género *Achyrocline*

En la región se conocen vulgarmente como marcela diferentes especies pertenecientes al género *Achyrocline*. Este género ha cambiado de tribu en sucesivas revisiones si bien actualmente se clasifica dentro de la tribu Gnaphalieae (14). Esta tribu, cuyo origen es Sudafricano (12), comprende alrededor de 180 géneros y 2.000 especies, con mayor diversidad en Sudáfrica y Australia (14). En el continente sudamericano existen 29 géneros con dos centros de diversidad, el primero incluye el sudeste de Brasil, parte de Argentina, Paraguay y Uruguay, en tanto que el segundo se encuentra en la región de la cordillera de los Andes (15). La tribu a su vez se divide en cinco subtribus, de las cuales Gnaphaliinae es la que contiene a *Achyrocline* junto con otros géneros como *Gamochoeta* Weddel, *Pseudognaphalium* Kirp., *Gnaphalium* L., entre otros (14). La gran similitud morfológica entre los géneros que conforman la tribu, y en especial la subtribu, hacen muy difícil su clasificación taxonómica (16).

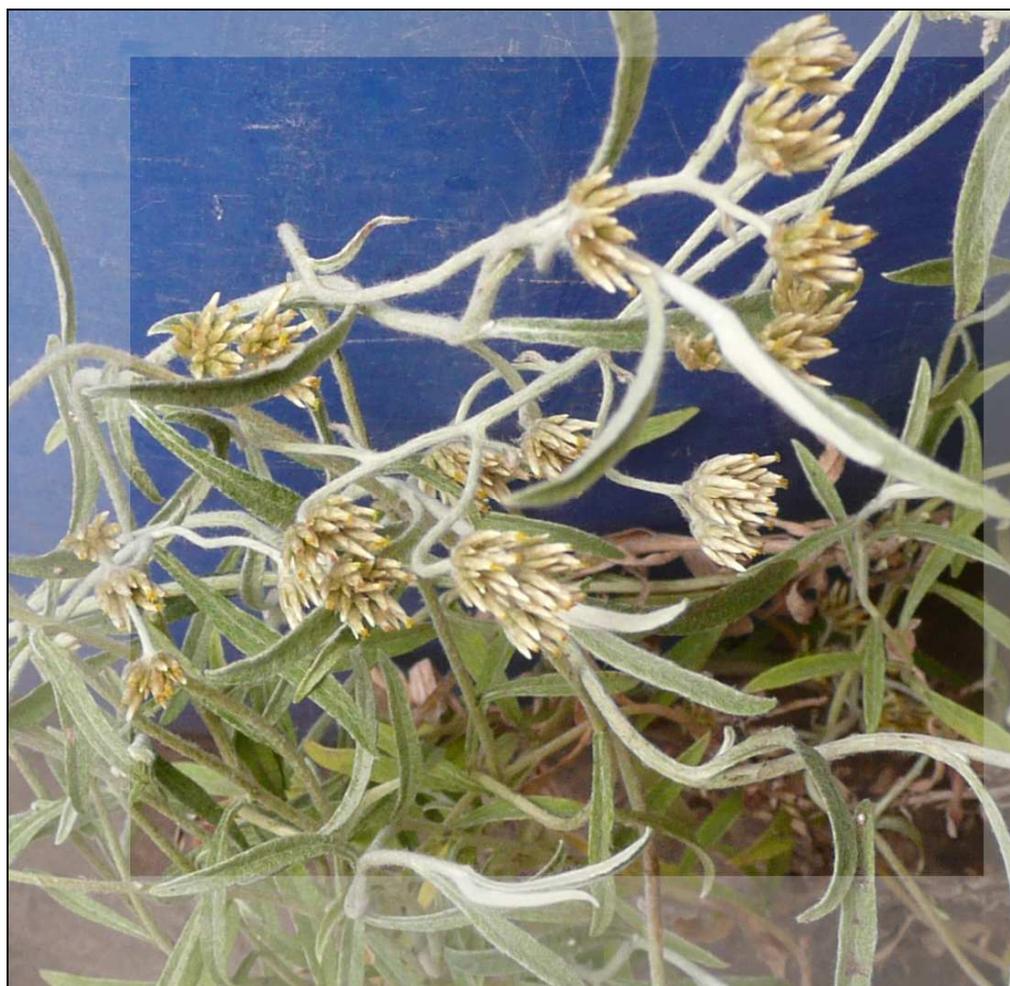
Dentro del género *Achyrocline* se engloban más de 40 especies presentes en América del Sur y Central, África y Madagascar, distribuidas en regiones tropicales y subtropicales mayoritariamente de América del Sur (14, 16). Son plantas a menudo aromáticas con propiedades medicinales. Generalmente arbustivas y perennes, con hojas sésiles, alternas, simples y de forma lanceolada. Presentan capítulos pequeños agrupados en glomérulos, reunidos a su vez en cimas que pueden ser corimbiformes o formar panojas terminales (5). Las flores marginales son femeninas, en cambio las flores del disco son hermafroditas. El fruto es una cipsela (o aquenio) algo comprimida, elipsoide y contiene una única semilla. El cáliz está

representado por un órgano especial, denominado *pappus*, que interviene en la diseminación de las semillas (5).

## 1.4 Especies nativas de marcelas

### 1.4.1 *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC

Vulgarmente conocida como marcela blanca, *A. satureioides* es una subarbusto de hasta 80 cm de altura (4). Presenta tallos muy ramificados desde la base y con pubescencia lanosa muy densa. Las hojas, de entre 8 y 75 mm de largo y 1 a 9 mm ancho, son



**FIGURA 2:** Fotografía de una planta de *Achyrocline satureioides* mantenida en invernadero, se ven las inflorescencias (capítulos) amarillo blancuzcos, gran número de hojas estrechamente lanceoladas de unos 50 mm de largo muy pubescentes.

generalmente de forma lanceolada con pubescencia lanosa muy densa sobretodo en la cara abaxial. Los capítulos tienen entre 4 y 8 flores, con 1 a 3 flores hermafroditas y 3 a 6 femeninas. El involucreo varía entre tonos amarillos a amarillo-rojizo y presenta entre 9 y 14 brácteas. Las cipselas miden entre 0,7 y 0,8 mm de longitud, son elipsoidales y presentan pequeñas papilas (5).

Es una especie nativa del sudeste subtropical y templado de Sudamérica. Su distribución incluye al sur de Brasil, Argentina y Paraguay. En Uruguay se encuentra en regiones campestres de serranías y suelo arenoso del sur, este y centro. El período de floración se extiende desde noviembre hasta el mes de abril (4).

#### **1.4.2 *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC**

Conocida como marcela hembra o marcela amarilla, *A. flaccida* es una planta de aspecto herbáceo (4) cuyas ramas pueden llegar hasta los 150 cm de largo. Los tallos son generalmente poco ramificados en la parte inferior y presentan pubescencia lanosa laxa. Las hojas miden alrededor de 15 a 110 mm de largo y 1,5 a 15 mm de ancho, tienen forma lanceolada a veces atenuadas en un corto pseudopecíolo, y presentan pubescencia que varía en la cara adaxial desde lanosa laxa a densa, siendo lanosa densa en la cara opuesta. Los capítulos incluyen de 4 a 6 flores, de las cuales 1 o 2 son hermafroditas y 4 o 5 femeninas. El involucreo es amarillo y presenta de 8 a 10 brácteas. Las cipselas, de alrededor de 0,7 y 0,8 mm de longitud, son elipsoidales y tienen pequeñas papilas (5).

Su distribución incluye a Venezuela, Colombia, Bolivia, norte Argentino, Uruguay y Brasil (16). En Uruguay se la encuentra a orillas de pajonales o bosques, en suelo arenoso, del sur-este y

litoral del río Uruguay. El período de floración comienza a fines de la primavera, en el mes de noviembre, y se extiende hasta el mes de abril (4).



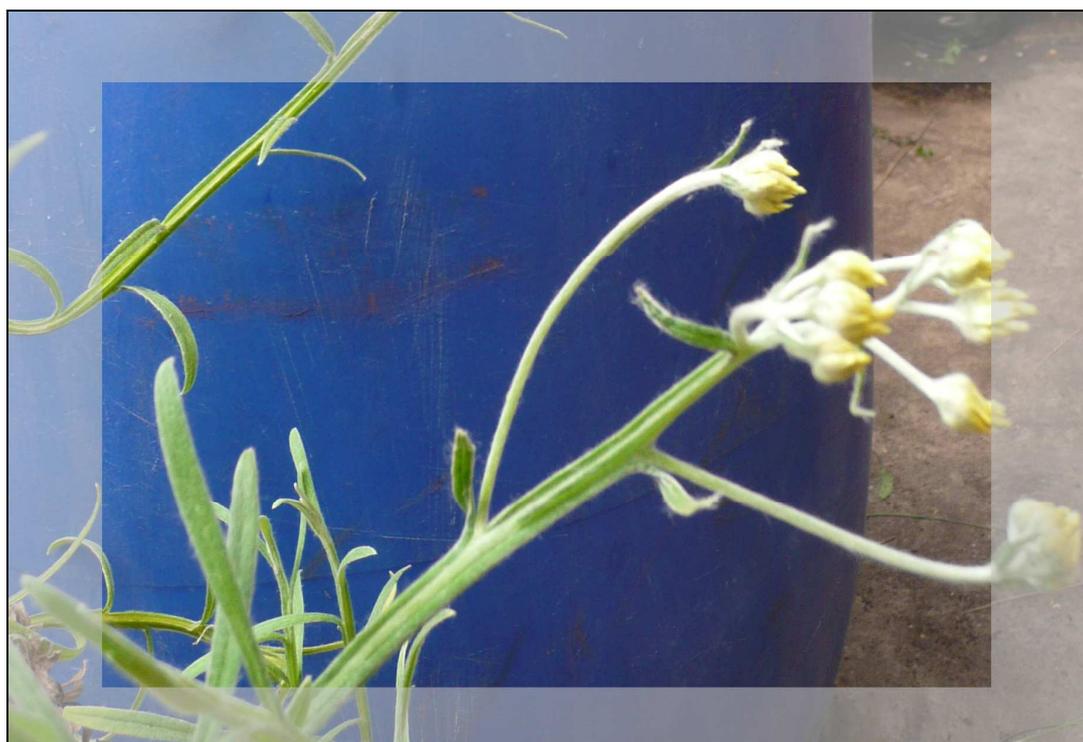
**FIGURA 3:** Fotografía de una planta mantenida en invernáculo de *Achyrocline flaccida*. Se muestran las inflorescencias de color amarillo, hojas lanceoladas de unos 70 mm de largo pubescentes.

#### 1.4.3 *Achyrocline alata* (HBK.) DC.

*Achyrocline alata*, vulgarmente conocida como Yateí-caá o marcela brasileira, es una planta que puede llegar hasta los 150 cm de altura. Presenta tallos con alas de hasta 4 mm de ancho, poco ramificados en la parte inferior y con pubescencia lanosa laxa entremezclada con pelos glandulares en la parte inferior. Las hojas, de entre 10 y 120 mm de largo y 1 a 12 mm de ancho, son lanceoladas, decurrentes y con pubescencia lanosa laxa en ambas

caras. Los capítulos contienen entre 4 y 11 flores, con 1 a 3 flores hermafroditas y 3 a 9 femeninas. El involucre varía entre tonos amarillo-blancuzco y amarillo-rojizo y presenta de 9 a 14 brácteas. Las cipselas son elipsoidales de alrededor de 1 mm de longitud, con papilas que varían desde muy pequeñas hasta grandes y visibles (5).

Se distribuye en el sur de Brasil, Argentina, Paraguay, Colombia, Perú y Uruguay (16). Se encuentra preferentemente en zonas húmedas anegadizas, orillas de bañados y lagunas (4). Florece entre verano y otoño.



**FIGURA 4:** Fotografía de una planta de *Achyrocline alata* mantenida en invernáculo. Se aprecia el tallo alado, las inflorescencias de color amarillo, y las hojas lanceoladas, poco pubescentes, de unos 50 mm de largo.

#### 1.4.4 Biotipos de *Achyrocline*

En el territorio uruguayo se han identificado tres biotipos o variantes morfológicas pertenecientes al género *Achyrocline*. Estas poblaciones están siendo estudiadas taxonómicamente en base a caracteres morfológicos (M. Bonifacino, com. pers.). Ejemplares de los mismos se encuentran herborizados en el Herbario “B. Rosengurtt” de Facultad de Agronomía (MVFA), designados como *A. sp.* “de la piedra”, *A. sp.* “de hoja fina” y *A. sp.* “costera” (Anexo I).

El biotipo “costera” fue recientemente determinada como *A. crassiuscula* (Malme) Deble & Marchiori (M. Bonifacino, com. pers.) y se localiza sobre suelo arenoso en regiones costeras de los departamentos de Rocha y Maldonado. Su distribución conocida incluye además, el litoral sur de Rio Grande do Sul, Brasil. Es una planta herbácea con tallos postrados o ascendentes, de 20 a 70 cm de altura. Las hojas miden de 0,5 a 5 cm de largo y 0,2 a 0,8 cm de ancho, son de forma oblanceoladas y tiene pubescencia lanosa en ambas caras. Esta especie florece en otoño y presenta numerosos capítulos de coloración amarillo dorado, que contienen entre 14 y 15 flores, con dos flores femeninas y entre 12 y 13 hermafroditas (16). El biotipo “de hoja fina”, se encuentra preferentemente en suelos rocosos, presenta flores blanquecinas y hojas de poco ancho en comparación con el resto de las especies. Ha sido descrito para algunas zonas de los departamentos de Durazno, Florida, Tacuarembó y Rocha. Mientras que el biotipo “de la piedra” se encuentra preferentemente en suelos rocosos de serranía mayoritariamente al sur del Río Negro así como en Tacuarembó, su flor es de un color amarillo muy intenso y presenta hojas de color blanquecino (Figura 5).



**FIGURA 5:** Fotografías de plantas pertenecientes a los biotipos de *Achyrocline* presentes en el Uruguay. Las fotos superiores corresponden a plantas de *A. sp.* biotipo “de la piedra” en serranía del departamento de Lavalleja. La foto inferior corresponde a planta de *A. sp.* biotipo “costera” en suelo arenoso a orillas de la Laguna Garzón en el departamento de Rocha.

## 1.5 Estudio de las propiedades aromáticas y medicinales de las marcelas

La familia Asteraceae es particularmente rica en metabolitos secundarios como fructanos del tipo de la inulina, lactones sesquiterpénicas (tóxicas), compuestos poliacetilénicos, alcoholes triterpénicos pentacíclicos, derivados del ácido cafeico, flavonas y flavonoides metilados, aceites característicos conteniendo ácidos grasos insaturados de 18 átomos de carbono, diterpenos típicos. Se caracteriza además por la total ausencia de taninos (17).

Las marcelas, así como muchas otras compuestas, son plantas aromáticas y medicinales. La cualidad aromática principalmente se debe a la presencia de terpenos y fenilpropanos. Un estudio desarrollado en Uruguay, en el marco de un proyecto realizado por INIA en participación con la Unión Europea, MGAP y las Facultades de Agronomía y Química denominado, "Centro de Orientación Técnica y Económica de las Plantas Aromáticas", tuvo como objetivo la obtención de aceites esenciales así como la domesticación y cultivo de especies nativas de varios géneros, dentro de las cuales se incluyó a *A. satureioides* y *A. flaccida*. En el mismo se identificaron y aislaron compuestos de aceites esenciales de *A. satureioides*, los resultados indican un 39,3% de hidrocarburos, 27,1% de monoterpenos, 15,3% de sesquiterpenos, y 3,1% de compuestos oxigenados al igual que de ésteres (18). Las propiedades medicinales de las marcelas se deben principalmente a la producción de polifenoles como flavonoides y derivados del ácido cafeico (19). Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales, que los protegen del daño oxidativo. El ser humano no produce estos metabolitos, por lo que deben ser ingeridos en la dieta (20). Análisis en los perfiles de flavonoides

para especímenes pertenecientes a *A. flaccida*, *A. satureioides*, *A. alata*, y *A. tomentosa* de diversas provincias de Argentina, demuestran la presencia de flavonoides específicos para cada especie (19).

Diversos estudios sobre las propiedades medicinales de *A. satureioides* han comprobado algunas de las propiedades que se le atribuyen popularmente, como antiespasmódica, antiinflamatoria, analgésica, coleréticas, (21), hepatoprotectora y digestiva (22). Además se ha probado su capacidad antibiótica sobre diversas especies de *Staphylococcus*, e inmunomoduladora en linfocitos humanos (23), así como su capacidad fotoprotectora (24). En tanto que diversos estudios comprueban que *A. flaccida* presenta actividades antimicrobiana (25, 26) y antiviral sobre Herpes simples, al igual que *A. alata* (27). En Uruguay, se llevó a cabo, en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), un estudio sobre las propiedades antioxidantes y citoprotectoras, en ejemplares pertenecientes a *A. flaccida*, *A. satureioides* y un material no determinado taxonómicamente y que denominan *A. sp.* colectado en la Gruta de los Helechos, departamento de Tacuarembó. El mismo concluyó que es *A. flaccida* la que presenta mayor cantidad total de flavonoides así como también mayor capacidad antioxidante. A su vez se observó que el ejemplar no identificado taxonómicamente de *Achyrocline* presenta una calidad muy baja de polifenoles, al punto tal de que no produce efecto citoprotector a diferencia de las otras dos. También se logró dilucidar que la cantidad e incluso la calidad de polifenoles varían según el sitio de colecta, y que para *A. satureioides* la calidad de polifenoides es más alta en la prefloración (28).

## 1.6 Estudios citogenéticos

Tan sólo una pequeña fracción de las especies pertenecientes a la familia Asteraceae han sido estudiadas a nivel citogenético. Sin embargo se observa una amplia variedad tanto en números cromosómicos, desde  $n = 2$  hasta poliploides con  $n = 114$  (12), como en morfologías cariotípicas, y patrones de evolución cromosómica que incluyen procesos de disploidía y poliploidía (29). El número cromosómico básico que se plantea para esta familia es de  $x = 9$ , si bien es aún un tema controversial (29, 30).

Esta amplia variación descrita para la familia a nivel citogenético y de patrones evolutivos se mantiene para la tribu Gnaphalieae, con números cromosómicos que van desde  $2n = 6$  en géneros como *Trichanthodium* y *Sondottia*, hasta  $2n = 120$ ,  $2n = 140$  en poliploides de varios géneros. El número básico también varía dentro de los distintos géneros de la tribu e incluso dentro de subtribus, no obstante algunos autores plantean a  $x = 14$  como el número cromosómico básico de la tribu (31). Se propone que es debido a un aumento en el tamaño genómico total que la tribu Gnaphalieae, así como las tribus Cardueae y Vernonieae ( $x = 17$ ), entre otras, presentan un mayor número básico que el esperado tomando en cuenta el propuesto para la familia (29). A nivel cariotípico se observan estructuras unimodales y bimodales (31).

Dentro de la subtribu Gnaphaliinae, según datos resumidos de diversos estudios, se evidencia que para el continente Americano, a excepción de *Gnaphalium* y *Pseudonaphalium*, que son poliploides, y *Belloa* con  $2n = 24$ , los géneros restantes presentan un complemento cromosómico de  $2n = 28$ . No obstante, para otras

regiones, exceptuando nuevamente a los poliploides, existen complementos cromosómicos de  $2n = 14$  y  $2n = 28$  (31).

Con referencia a la citogenética del género *Achyrocline*, la información es escasa. Se ha publicado el número cromosómico de  $2n = 28$  para *A. satureioides* de Colombia y Argentina, (32, 33), en cambio se plantea para poblaciones de Rio Grande do Sul un número cromosómico de  $2n = 24$  (34). El número citado para *A. alata* de poblaciones de Ecuador y Perú es de  $2n = 28$  (35, 36, 37), al igual que para *A. trianae* Klett de Ecuador (36). No se tiene información para *A. flaccida* y *A. crassiuscula*. Dada la variación en número cromosómico básico y estructura cariotípica existente en la familia, e incluso dentro de géneros pertenecientes a la misma tribu que *Achyrocline*, es que se considera factible la presencia de variabilidad a nivel citogenético entre los materiales utilizados en este trabajo.

El estudio que se plantea realizar en este trabajo es el primer abordaje para especie y biotipos de Uruguay tanto en relación a conteo cromosómico, análisis cariotípico comparado y análisis del contenido de ADN. A su vez, este estudio forma parte de un proyecto mayor que abarca estudios de taxonomía morfológica clásica, determinación por FISH de la localización de cistrones ribosomales y análisis comparativos de secuencias cloroplásticas.

## **2. Objetivos general y específicos.**

### **Hipótesis de trabajo.**

#### **Objetivo general:**

Identificar y caracterizar las especies y biotipos del género *Achyrocline* nativas de Uruguay mediante marcadores cromosómicos y de contenido de ADN genómico.

#### **Objetivos específicos:**

Caracterizar y analizar comparativamente las especies y biotipos de marcelas citadas para Uruguay: *Achyrocline satureioides*, *A. flaccida*, *A. alata*, *A. sp.* “de la piedra” y *A. sp.* “costera”, en relación al número cromosómico somático, cariotipo y contenido de ADN nuclear.

Desarrollar un protocolo para la obtención de preparaciones citológicas a partir de meristema radicular, que permita la caracterización citogenética de las especies y biotipos de marcelas nativas de Uruguay previamente mencionadas.

#### **Hipótesis de trabajo:**

*A. satureioides*, *A. flaccida*, *A. alata*, *A. sp.* “de la piedra” y *A. sp.* “costera” presentan diferenciación a nivel citogenético y en relación a su contenido de ADN nuclear.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

### 3.1 Materiales.

Con la finalidad de obtener una muestra representativa de la diversidad del género *Achyrocline* en Uruguay, se realizó la colecta de individuos de poblaciones naturales de marcela, tanto de hábitat costero, como de serranía, bañado y pradera (Figura 6).



**FIGURA 6:** Fotografías de diversos ecosistemas donde se colectaron ejemplares de marcelas utilizados en este trabajo. Foto superior izquierda, población natural de *A. alata* de Baños de Guazubirá, Canelones. Foto inferior izquierda, imagen de *A. sp.* biotipo "costera" sobre la costa de la Laguna Garzón, Rocha. Fotos superior e inferior derecha, poblaciones de *A. sp.* biotipo "de la piedra" y *A. satireoides* respectivamente, que conviven en las serranías del Salto del Penitente en Lavalleja. Foto central, *A. sp.* biotipo "de la piedra" proveniente de las serranías de Lavalleja

El plan de colecta fue diseñado en base al análisis de las entradas del Herbario "B. Rosengurtt" de Facultad de Agronomía (MVFA), del cual se obtuvo datos sobre la morfología y ubicación de las especies y biotipos de *Achyrocline*. Se realizaron 27 salidas de colecta que abarcaron nueve departamentos del territorio nacional (Figura 7), de las cuales surgen orígenes nuevos para algunas especies y biotipos de marcelas. Se obtuvieron 97 especímenes vivos pertenecientes a las especies *Achyrocline satureioides*, *A. flaccida*, *A. alata*, y los biotipos *A. sp.* "de la piedra", *A. sp.* "costera".

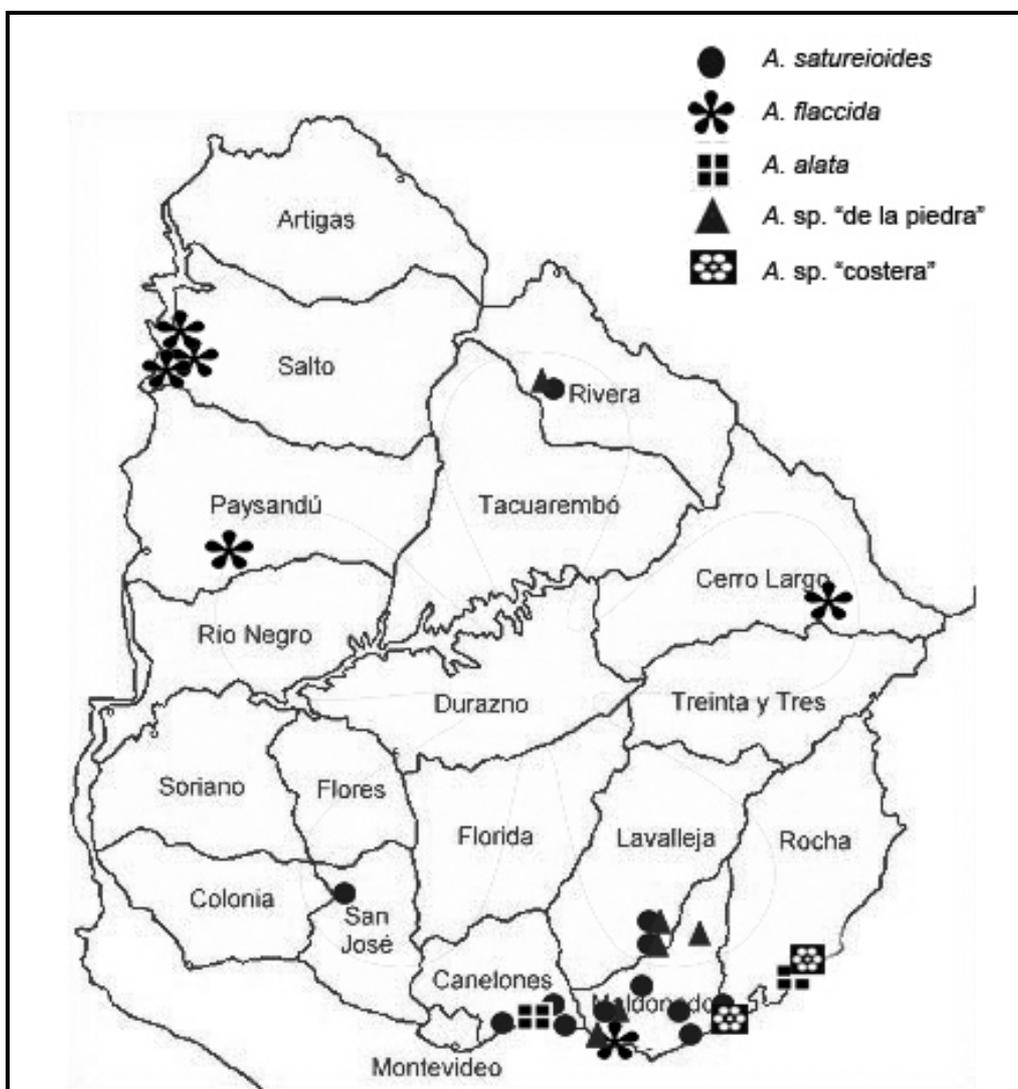


FIGURA 7: Mapa del Uruguay indicando los principales sitios de colecta

Los ejemplares colectados fueron acondicionados y mantenidos en un invernáculo del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Agronomía, en el predio de Sayago. Para el mantenimiento de las plantas vivas, preparación de la tierra, riego y control de plagas, se contó con la colaboración de los funcionarios técnicos Sr. Julio Sburlatti y Sr. Gustavo Oliveras.



**FIGURA 8:** Fotografía del invernáculo de Sayago de la Facultad de Agronomía. Foto superior izquierda, vista de invernáculo. Foto inferior izquierda, imagen de inflorescencias de *A. flaccida*. Foto superior derecha, imagen de un individuo perteneciente a *A. flaccida*. Foto inferior derecha, vista de invernáculo en donde se puede observar individuos pertenecientes a varias especies en estudio entre ellas varias marcelas.

En la Tabla 1 se muestra los datos de los individuos efectivamente utilizados en este trabajo, distinguiendo en cada especie o biotipo el número de individuos colectados, los respectivos códigos de ingreso como planta viva al Invernáculo y datos de localización.

**TABLA 1:** Individuos colectados de poblaciones naturales utilizados en este estudio.

<b>Especie</b>	<b>Planta</b>	<b>Origen</b>
<i>A. satureioides</i>	A01	Maldonado. Ruta 60 Km 29
	A08	Canelones, Pinar
	A11	Canelones, Guazubirá nuevo
	A12	Canelones, Guazubirá nuevo
	A20	Maldonado, Ruta 12 Km 26
	A21	Maldonado, Ruta 12 Km 26
	A22	Maldonado, Ruta 12 Parada Cerro Dos Hermanos
	A23	Maldonado, Ruta 12 Parada Cerro Dos Hermanos
	A44	Maldonado, Ruta 10 Km 187.5
	A47	Canelones, Cuchilla Alta
	A73	Canelones, Guazubirá nuevo
	A74	Maldonado, a 6mts de Laguna Garzón
	A75	Canelones, Guazubirá nuevo
	<i>A. flaccida</i>	A05
A14		Maldonado, Cerro de los Burros
A19		San José
A28		Salto, Ruta 3 Km 503.5
A29		Salto, Ruta 3 Km 503.5
A30		Salto, Ruta 3 Km 503.5
A34		San José
A64		Salto, Parque del Lago
A67		Paysandú, Ruta 90, Pueblo Orgoroso
A68		Paysandú, Ruta 90, Pueblo Orgoroso
<i>A. alata</i>	A13	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia
	A69	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia
	A70	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia
	A71	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia
	A89	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia
	A90	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia
	A94	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia
<i>A. sp. "de la piedra"</i>	A04	Maldonado, R109 después de bifurcación hacia el cerro Cordillera
	A35	San José, Sierra de Mahoma
	A38	San José, Sierra de Mahoma
	A41	Maldonado, Ruta 60 Km 21
	A45	Maldonado. Ruta 60 Km 29
	A53	Maldonado. Ruta 60 Km 29
	A54	Maldonado. Ruta 60 Km 29
	A65	Maldonado. Ruta 60 Km 29
<i>A. sp. "costera"</i>	A76	Rocha, a 6mts de Laguna Garzón
	A77	Rocha, a 6mts de Laguna Garzón
	A78	Rocha, a 6mts de Laguna Garzón
	A87	Rocha, entrada Camping La Rubia

Por otro lado en el Anexo II se presenta la base de datos de todas las colectas realizadas, incluyendo además localización por GPS, fecha de colecta y nombre de los colectores. En el Anexo III se muestra los materiales Herborizados (con la colaboración de MSc. M. Vaio), y enviados al Herbario MVFA de Facultad de Agronomía.

## **3.2 Métodos.**

### **3.2.1 Obtención de raíces para preparados citológicos**

Con el propósito de obtener raíces con elevada proporción meristemática y poder lograr buenas preparaciones citológicas durante todo el año, se llevaron a cabo dos procedimientos: germinación de semillas, extracción de raíz de plantas de invernáculo.

#### **3.2.1.1 Germinación de semillas**

Para obtener material de estudio constante a lo largo del año independientemente del período de crecimiento natural de la planta, se germinaron semillas y se extrajeron las raíces de los plantines.

En una primera instancia se germinaron únicamente semillas consideradas viables. Con este objetivo se aislaron las cipselas manualmente bajo lupa, separándolas de restos de brácteas y de *pappus*, para luego clasificarlas en base a características morfológicas externas observables bajo la lupa. Se seleccionaron como cipselas que contenían semillas viables, aquellas que

mantenían la forma característica elipsoide algo comprimida, que presentaban un tamaño entre 0,7, y 0,8 mm de longitud y un color marrón oscuro a marrón amarillento. Además se tuvo en cuenta que no se encontrara rota. Este procedimiento fue aplicado a muestras de dos individuos pertenecientes a la especie *A. flaccida*, individuos A19 y A05. Se colocaron 20 semillas clasificadas como viables por individuo en placas de Petri con una proporción de 1:2 de peso en gramos de papel por agua destilada. La prueba fue realizada en una cámara de germinación Heatcraft inc. Model CCHK17AE del Banco de Germoplasma de la Facultad de Agronomía, con la supervisión de la Ing. Agr. Ana Tardáguila. Se llevó a cabo a una temperatura constante de 25° C y luz continua, evaluándose de esta manera un protocolo de germinación propuesto para *A. saturoioides* (38). No se realizó ningún pretratamiento. Las raíces fueron extraídas a los 21 días del inicio de la prueba.

Luego se germinaron muestras aleatorias de 200 semillas de las distintas especies y biotipos. De manera que una vez aisladas las cipselas, fueron almacenadas en sobres de papel a condiciones ambientales hasta su uso. Para el ensayo se utilizó el mismo protocolo descrito anteriormente, con 100 semillas por placa de Petri. Mayoritariamente, las muestras de semillas utilizadas fueron colectadas de al menos diez plantas de una misma población (utilizando el código AS seguido del número de ingreso al invernáculo del ejemplar colectado de dicha población). Los tiempos de almacenamiento de las muestras variaron entre especies, como se muestra en la Tabla 2. Las raíces se extrajeron a los 21 días. Como dato adicional se tomó el peso en gramos de una muestra aleatoria de 500 cipselas del individuo A19.

**TABLA 2:** Resume las muestras utilizadas para la prueba de germinación, su origen y tiempo de almacenamiento hasta el inicio de la prueba.

<b>Especie</b>	<b>Individuo</b>	<b>Origen</b>	<b>Almacenaje</b>
<i>A. saturoioides</i>	As A73	Canelones	6 meses
<i>A. flaccida</i>	As A64	Salto	1 1/2 mes
<i>A. alata</i>	As A90	Canelones	6 meses
<i>A. sp. "costera"</i>	As A76	Maldonado	6 meses
			6 meses
<i>A. flaccida</i>	A34	San José	1 año
			1 1/2 mes
<i>A. sp. "de la piedra"</i>	As A65	Maldonado	8 meses

### 3.2.1.2 Extracción de raíz de plantas de invernáculo

Como segunda metodología, se obtuvo raíces de plantas extraídas de poblaciones naturales mantenidas en invernáculo. Con este objetivo se recolectaron plantas de poblaciones naturales y tras un período de adaptación a las condiciones de crecimiento en maceta en invernáculo, se procedió a analizar sus raíces. Cada individuo fue analizado no más de una vez cada 15 días, para así permitir que se recupere de la agresión causada. Este procedimiento fue llevado a cabo preferentemente en días soleados y en un rango horario cercano a las diez de la mañana, debido a que la mayoría de las especies presentan en este horario una mayor proporción de células en profases (38). Se seleccionó raíces en crecimiento, es decir aquellas que muestran un color blanquecino, con una extensa región meristemática.

### 3.2.2 Pretratamiento de los meristemas radiculares

Las raíces fueron pretratadas para obtener la mayor cantidad de metafases mediante la destrucción del huso mitótico, utilizando 8-hidroxyquinolina 2 mM. Se las colocó en un frasco de vidrio junto al antimitótico. Se mantuvieron 2 h a temperatura

ambiente y posteriormente otras 2 h en heladera a 4° C, siempre en un sistema abierto. Posteriormente se las lavó con agua destilada y luego con solución Carnoy 3:1 (Etanol: Acido acético glacial). La fijación definitiva se realizó en solución Carnoy 3:1 durante 24 h a temperatura ambiente en un frasco tapado, con agitación durante la primera media hora. Se almacenaron en heladera en la misma solución 3:1 o en etanol 70 %, hasta su uso.

### **3.2.3 Obtención de preparados citológicos**

Para obtener las preparaciones citológicas se colocaron las raíces pretratadas sobre un portaobjeto, manteniéndolas húmedas con agua destilada, y se las cortó dejando únicamente la región meristemática. Posteriormente se le adicionó 8 µL de la solución enzimática tipo A de celulasa/pectinasa (Anexo IV) y se la dejó actuar durante 2 h a 37° C dentro de una cámara húmeda para evitar que se sequen. Luego se retiró la solución A con un papel de filtro asegurando no absorber parte del preparado y se agregó 8 µL de la solución enzimática tipo B (Anexo IV), cuyo tiempo de acción varió entre 45 a 60 min dependiendo de la raíz. Para remover el exceso de citoplasma y proteínas se adicionó 5 µL ácido acético 60 % sin previa extracción de la solución enzimática B, y se lo dejó actuar por cinco min. Mediante agujas histológicas, se retiró la cofia y sobre las células en suspensión se colocó un cubreobjetos para luego proceder al aplastado. De esta manera el material permite una buena dispersión de los cromosomas para su correcta identificación. Para corroborar el estado de los mismos, se observaron en microscopio de contraste de fases, y los que presentaban por lo menos cinco metafases o prometafases fueron introducidos en nitrógeno líquido por aproximadamente 5 s removiéndose luego el cubreobjetos con una hoja de afeitar.

Posteriormente se los dejó secar a temperatura ambiente y se los almacenó en heladera.

### 3.2.4 Tinción del preparado con orceína lacto-propiónica

Con el fin de realizar el conteo del número cromosómico y cariotipos de las distintas especies y biotipos de marcelas, las preparaciones citológicas obtenidas fueron coloreadas con 5  $\mu$ L orceína lacto-propiónica al 2 %. Al colocar el cubreobjetos se tuvo la precaución de no formar ninguna burbuja de aire y se sellaron con esmalte de uñas incoloro.

### 3.2.5 Número cromosómico y cariotipo

El conteo del número cromosómico somático fue realizado en al menos 6 individuos por especie o biotipo intentando abarcar una amplia variedad de orígenes (Tabla 3). Posteriormente se realizaron cariotipos en función del largo de los pares cromosómicos, en tres o cuatro individuos por especie utilizando un programa de tratamiento de imágenes estándar. Se tomaron las medidas de los brazos cromosómicos de los mejores cariotipos obtenidos con el programa Image-j (Tabla 3). Luego se calculó la centría de los pares cromosómicos según la nomenclatura propuesta por Levan *et al.* en 1964 (40), mediante el cálculo de los siguientes índices para cada par cromosómico:

$$r = l/s \quad i = 100s / c$$

donde: l es el tamaño del brazo largo

s es el tamaño del brazo corto

c es el largo total del cromosoma (l +s)

**TABLA 3:** Individuos utilizados para el conteo del número cromosómico somático ( $2n$ ), para la realización de cariotipos y para la medición de longitudes cromosómicas.

Especie	Planta	$2n$	Cariotipo	Medidas
<i>A. satureioides</i>	A01	√		
	A08	√	√	
	A11	√		
	A12	√		
	A20	√	√	
	A21	√		
	A22	√		
	A23	√		
	A44	√	√	√
	A47	√		
	A73	√	√	√
	A74	√	√	√
	<i>A. flaccida</i>	A14	√	
A28		√	√	√
A29		√	√	√
A30		√	√	
A64		√		
A67		√	√	√
<i>A. alata</i>	A68	√		
	A69	√	√	√
	A70	√	√	√
	A71	√		
	A89	√		
	A90	√	√	√
<i>A. sp. "de la piedra"</i>	A94	√		
	A04	√	√	√
	A35	√		
	A38	√		
	A41	√		
	A45	√	√	√
<i>A. sp. "costera"</i>	A53	√		
	A65	√	√	√
	A77	√	√	√
	A78	√		

En el caso del biotipo *A. sp. "costera"* no se obtuvieron buenos preparados, y debido a la supervivencia tan baja de las mismas en el invernáculo, no se pudieron realizar nuevos ensayos, de manera que el conteo de número cromosómico fue realizado en dos individuos, mientras que se cariotipó tan sólo una metafase.

### 3.2.6 Tinción del preparado con CMA3/DAPI

A los efectos de caracterizar las especies y biotipos, realizar los estudios comparativos entre ellos, y analizar si existe variabilidad intraespecífica, se aplicó la tinción con CMA3 y DAPI los cuales tiñen selectivamente regiones ricas en GC y AT respectivamente.

El bandeado por contratinción con los fluorocromos DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) y CMA3 (cromomicina A3) fue realizado en preparaciones con más de cinco buenas metafases. Para esto se seleccionaron tres individuos por especie o biotipo. Al momento de escoger los preparados utilizados se tuvo en cuenta siempre que fue posible que los individuos analizados pertenecieran a distintas accesiones, como se resume en la Tabla 4. En el caso de *A. sp. "costera"* al no obtenerse un número suficiente de buenas preparaciones, se priorizó el teñirlas con orceína y no fueron analizadas con esta técnica.

TABLA 4: Individuos seleccionados para la tinción con CMA/DAPI.

Especie	Planta	Origen
<i>A. satureioides</i>	A11	Canelones, Bañados de Guazubirá
	A22	Maldonado, Ruta 12, Cerro Dos Hermanos
	A44	Maldonado, Ruta 10 Km 187.5
<i>A. flaccida</i>	A14	Maldonado, Cerro de los Burros
	A29	Salto, Ruta 3 Km 503.5
<i>A. alata</i>	A68	Paysandú, Ruta 90, Pueblo Orogoso
	A70	Canelones, Bañados de Guazubirá
	A89	Canelones, Bañados de Guazubirá
<i>A. sp. "de la piedra"</i>	A90	Canelones, Bañados de Guazubirá
	A04	Maldonado, Ruta 109, Cerro Cordillera
	A38	San José, Sierra de Mahoma
	A45	Maldonado, Ruta 60 Km 29

Previo al análisis con los fluorocromos, las preparaciones se tiñeron con DAPI/Glicerol, a los efectos de corroborar la presencia de buenas metafases y obtener las coordenadas. Este

procedimiento facilita la toma fotográfica, ya que disminuye el tiempo de exposición a la luz de los fluorocromos, que de otra manera se “desvanecen”.

Se utilizaron preparaciones previamente envejecidas por tres días a temperatura ambiente. Para la tinción con CMA3 (Sigma) y contratinción con DAPI, se siguió el protocolo de Schweizer y Ambros de 1994 (41), de manera que los preparados se tiñeron con 10  $\mu$ L de cromomicina A3 (CMA, 0,5 mg/mL), se cubrieron con un cubreobjetos y se incubaron en cámara húmeda (placa de Petri con papel humedecido) durante una hora a temperatura ambiente, asegurando total oscuridad. Luego se lavaron los preparados con agua destilada y se secaron con una pera de goma. Para la contratinción se colocaron 10  $\mu$ L de DAPI (2  $\mu$ g/mL) bajo las mismas condiciones usadas anteriormente, durante 30 min. Posteriormente los preparados fueron lavados nuevamente con agua destilada, secados con pipeta de goma, y montados en tampón McIlvanine (pH 7)/glicerol (v/v 1:1). Previo a la observación, se dejaron incubar durante tres días en total oscuridad.

### **3.2.7 Observación y fotografía**

El análisis de los resultados obtenidos tras la técnica tinción con orceína así como con fluorocromos se realizó en una primera instancia por observación en microscopio (Olympus new Vanox con fluorescencia) y posteriormente mediante fotografías digitales levantadas con Cámara Digital Olympus DP71 (programa DP Manager), y procesadas utilizando programas estándares de procesamiento de imágenes.

### 3.2.8 Análisis de contenido de ADN

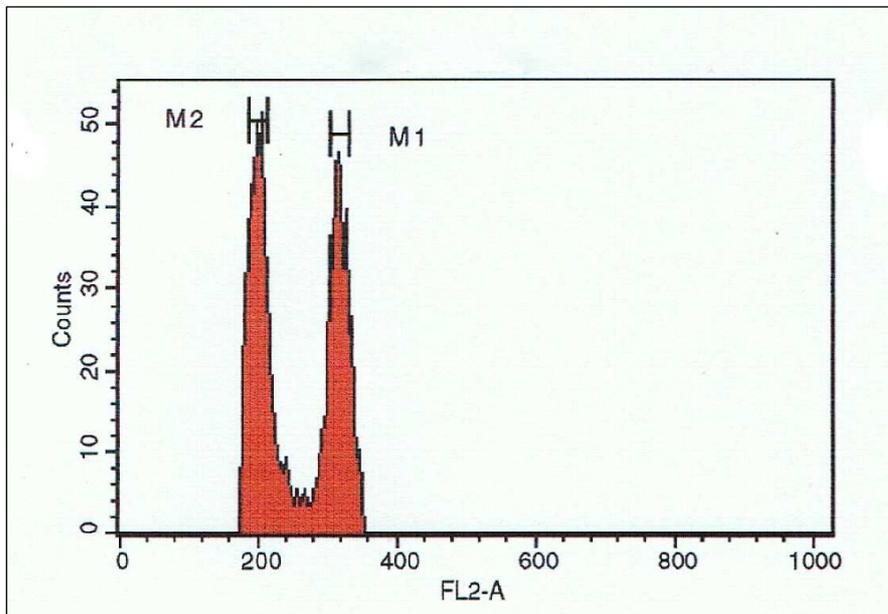
El análisis de contenido de ADN de las tres especies y los dos biotipos, se solicitó al Servicio de Clasificación Celular y Citometría de Flujo del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), del cual es responsable el Dr. Gustavo Folle.

El procesamiento de las hojas y su análisis en el citómetro de flujo lo realizaron la Ing. Agr. B López- Carro, la MSc. M Vaio y el Lic. F Santiñaque. Se utilizó el protocolo de Dolezel y Gødhe, 1995 (42) con las modificaciones introducidas por Vaio *et al.* (com. pers.). Se analizaron tres o cuatro individuos por especie o biotipo, con tres mediciones por planta. Los núcleos se tiñeron con yoduro de propidio (50 µg/mL) y se determinó la fluorescencia relativa de las muestras obtenidas mediante un citómetro de flujo Facs Vantage (Becton Dickinson) equipado con láseres Innova 304 y 305, previamente calibrado. Los datos obtenidos se procesaron con el programa Cell Quest. Se utilizó como estándar interno la especie *Pisum sativum* (2C = 9.09 pg). El contenido total de ADN se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de ADN nuclear } 2C = \frac{\text{media del pico G1 muestra}}{\text{media del pico G1 estándar}} \times \text{contenido de ADN } 2C \text{ del estándar}$$

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente para determinar si existen diferencias intraespecíficas e interespecíficas en el contenido de ADN (M. Vaio). En una primera instancia se realizó un análisis de varianza para determinar si hay diferencia significativa entre las medias de las especies (con un valor crítico de 0,05). Luego se estudió la

variación de la media entre pares de especies mediante el test de Tukey para muestras desbalanceadas, con un valor crítico de 0,01.



**FIGURA 9:**  
Contenido de ADN relativo, M2 hace referencia a la muestra utilizada, y M1 a la especie usada como estándar *Pisum sativum*.

## **4. RESULTADOS**

---

## 4.1 Obtención de preparaciones citológicas

Se desarrolló un protocolo que permitió obtener preparaciones citológicas de las especies y biotipos de marcelas nativas de Uruguay, con el propósito de caracterizarlas y analizarlas comparativamente mediante marcadores citogenéticos.

El primer paso fue la obtención del material de trabajo, por lo que se llevaron a cabo dos estrategias: extracción de meristema radicular mediante la germinación de semillas, y extracción de raíces de plantas mantenidas en invernáculo. Con la primera metodología se lograron pocas preparaciones citológicas debido al extremadamente fino espesor de las radículas y escasa población meristemática. No obstante, este procedimiento proporcionó datos adicionales al objetivo de este trabajo. Por un lado, propone un mecanismo eficaz de selección de semillas viables basado en la morfología de la cipsela para *A. flaccida*. Esto se debe a que germinaron las 20 semillas seleccionadas como viables por individuo (A19 y A05), que fueron expuestas a condiciones de germinación. Además, los resultados de las pruebas de germinación de muestras aleatorias de 200 semillas llevadas a cabo proporcionan datos preliminares de porcentaje de germinación para muestras pertenecientes a *A. alata* y a los dos biotipos, y añaden, a su vez, información para *A. satureioides* y *A. flaccida*. Los resultados obtenidos indican alrededor de un 70 % de germinación a los 21 días de iniciada la prueba, para *A. flaccida*, incluso en muestras almacenadas por un año. El biotipo “de la piedra” produjo un 64 % de germinación para muestras almacenadas durante un mes y medio, sin embargo este porcentaje decae un 16 % cuando el tiempo de almacenaje se extiende a ocho meses. *A. satureioides* muestra un 41 % de germinación a los seis

meses de la colecta, en cambio se observan valores de 6,5 y 4,5 % en muestras de *A. alata* y el biotipo "costera", respectivamente, con seis meses de almacenamiento en ambos casos (Tabla 5). Por otro lado, el peso de una muestra azarosa de 500 semillas de un individuo (A19) fue de 0,014 g.

**TABLA 5:** Resumen de los resultados de las pruebas de germinación a los 21 días, realizadas para muestras aleatorias de 200 semillas.

<b>Especie</b>	<b>Muestra</b>	<b>Origen</b>	<b>% Germinación</b>	<b>Almacenaje</b>
<i>A. saturoioides</i>	AS A73	Canelones	<b>41</b>	6 meses
<i>A. flaccida</i>	AS A64	Salto	<b>69</b>	1 1/2 mes
<i>A. alata</i>	AS A90	Canelones	<b>6,5</b>	6 meses
<i>A. sp. "costera"</i>	AS A76	Rocha	<b>4,5</b>	6 meses
<i>A. flaccida</i>	A34	San José	<b>76</b>	6 meses
			<b>72</b>	1 año
<i>A. sp. "de la piedra"</i>	As A65	Maldonado	<b>64</b>	1 1/2 mes
			<b>48</b>	8 meses

La segunda metodología empleada para obtener meristema radicular, consistió en la extracción de raíces de plantas mantenidas en invernáculo. Este procedimiento, si bien permitió la realización de buenas preparaciones citológicas, presenta dos grandes desventajas. La primera es que muchas plantas no se adaptan a las condiciones de invernáculo y mueren. Además, depende del ciclo vegetativo de la planta, por lo que se requirió determinar el momento del ciclo de cada material en donde hubieran raíces adecuadas para ser colectadas. El mejor período fue en primavera entre los meses de octubre y diciembre para las tres especies y los dos biotipos.

Por otro lado, la elaboración de preparados requirió de un proceso de puesta a punto en el laboratorio para lograr un adecuado ablandamiento de los meristemas por medio de las soluciones enzimáticas. A su vez el exceso de citoplasma se logró disminuir por la adición de ácido acético 60% antes de la

disgregación de las células. Si bien se probaron otras metodologías como diferentes concentraciones de ácido acético, mayores tiempos de acción de este ácido, realización de flameado inmediatamente luego del aplastado, o el sumergir los portaobjetos previamente fijados con nitrógeno líquido a ácido acético 70 % a 40° C durante 5, 7 o 10 minutos, la técnica seleccionada como la mejor para las especies del género *Achyrocline* se describen en Materiales y Métodos, en el ítem 3.2.3.

## 4.2 Número cromosómico y cariotipo

El número cromosómico somático observado tras la tinción con orceína lacto-propiónica fue de  $2n = 28$  para todos los ejemplares analizados de las especies *Achyrocline satureioides*, *A. flaccida*, *A. alata* y de los biotipos *A. sp* “de la piedra” y *A. sp.* “costera” (Figura 10).

Los cariotipos de *A. satureioides*, *A. flaccida*, *A. alata* y de los biotipos *A. sp* “de la piedra” y *A. sp.* “costera” (Figuras 11 a 15), realizados en función del largo cromosómico y localización del centrómero, presentan una estructura en gradiente, en la cual los tamaños cromosómicos disminuyen gradualmente desde medianos hasta pequeños (sólo el par 1 dependiendo del grado de condensación, en algunas prometafases sobrepasa las 5 micras, límite entre grandes y medianos) según la clasificación de Guerra (43). En la Tabla 6 se muestra el rango de variación de los tamaños cromosómicos para cada especie y biotipo. A su vez, los 14 pares cromosómicos poseen, en todas las especies y biotipos, heteropicnosis negativa a nivel centromérico una vez teñidos con orceína, y únicamente el par 10 presenta además una banda negativa que continúa en la región pericentrométrica.

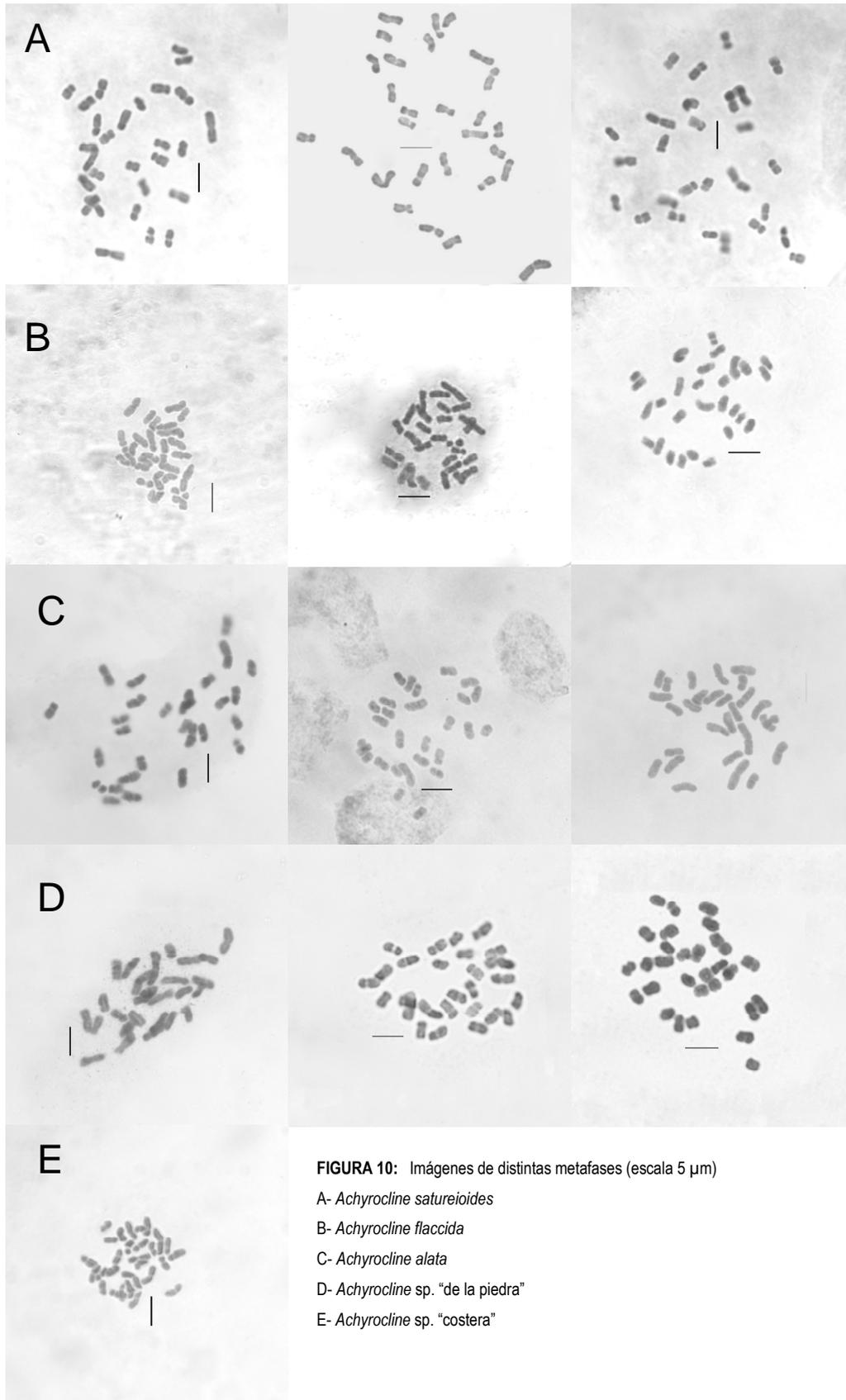


FIGURA 10: Imágenes de distintas metafases (escala 5  $\mu\text{m}$ )

A- *Achyrocline satureioides*

B- *Achyrocline flaccida*

C- *Achyrocline alata*

D- *Achyrocline* sp. "de la piedra"

E- *Achyrocline* sp. "costera"

TABLA 6: Muestra el largo total en  $\mu\text{m}$  del par cromosómico mayor y menor, calculado como el promedio de tres metafases, para cada especie y biotipo.

<b>Especie</b>	<b>Largo Par 1</b>	<b>Largo Par 14</b>
<i>A. saturoioides</i>	5,214	2,210
<i>A. flaccida</i>	4,384	1,744
<i>A. alata</i>	4,277	1,930
<i>A. sp. "de la piedra"</i>	4,477	2,205
<i>A. sp. "costera"</i>	4,669	2,066

En la Figura 10 se observan las prometafases y metafases donde se realizó la cuantificación para obtener los índices de Levan. En base a los índices calculados la clasificación de los pares cromosómicos según su centría es: metacéntricos los pares 1, 3, 6, 9, 10, 11, 12, 13 y 14, y submetacéntricos los pares 2, 4, 5, 7 y 8. Por ello todos presentan una fórmula cromosómica de  $9\text{ m} + 5\text{ sm}$  según Levan (40). En el Anexo V se encuentra la base de datos de los índices de Levan realizados.

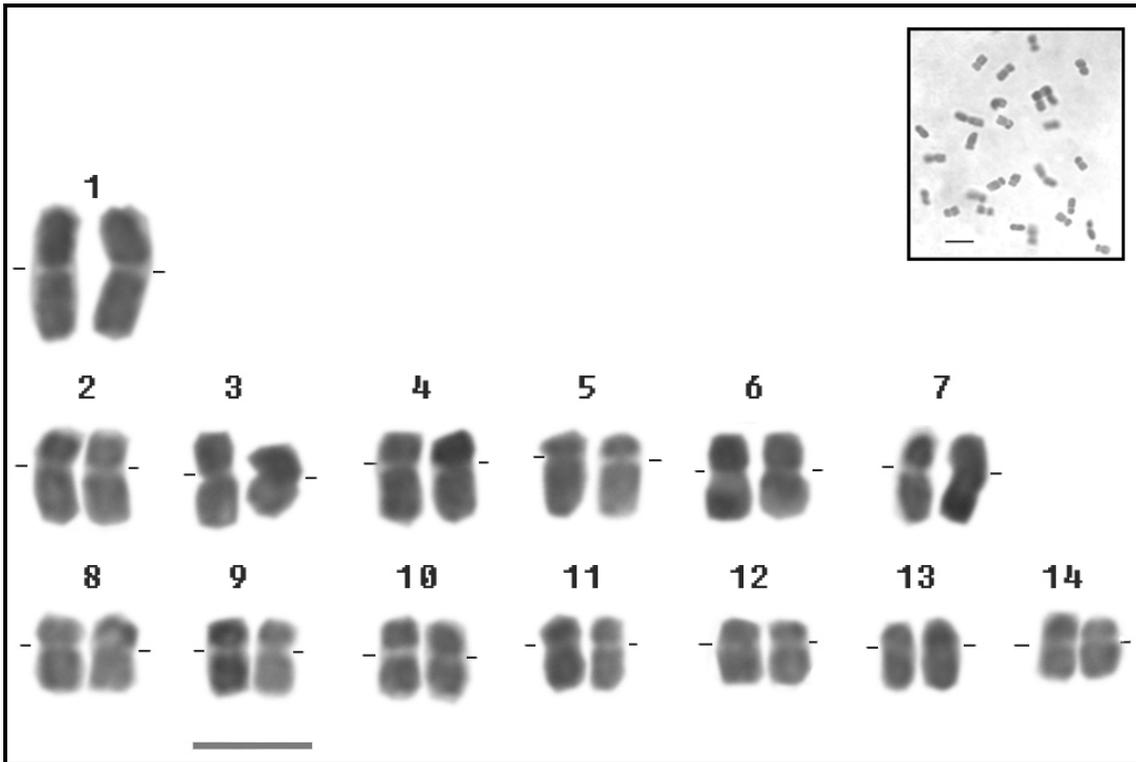


FIGURA 11: Cariotipo de *Achyrocline satureioides* (escala de 5  $\mu$ m). En el recuadro se observa la foto de la metafase utilizada.

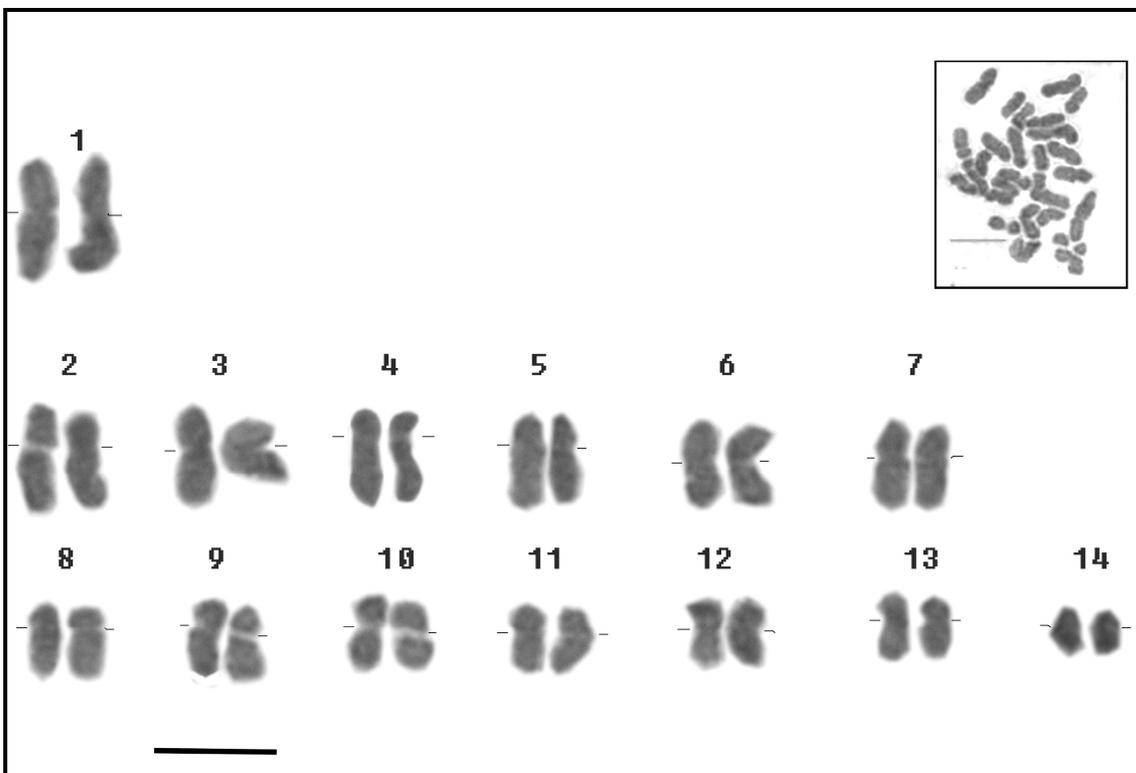


FIGURA 12: Cariotipo de *Achyrocline flaccida* (escala de 5  $\mu$ m). En el recuadro se observa la foto de la metafase utilizada.

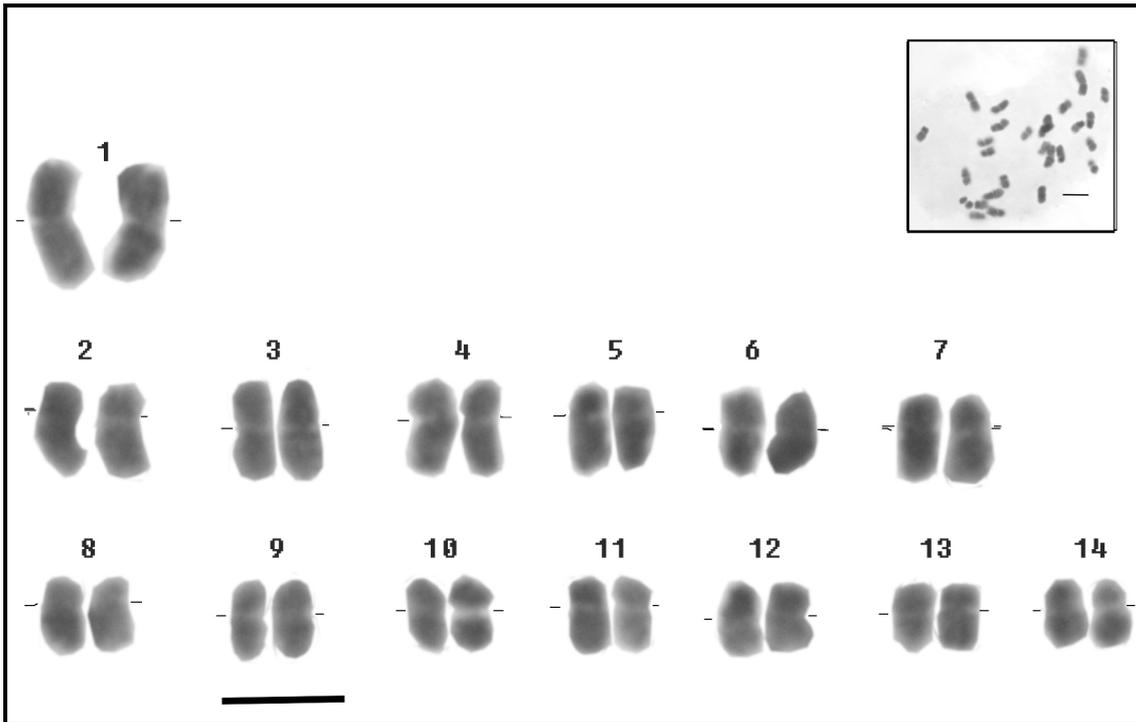


FIGURA 13: Cariotipo de *A. alata* (escala de 5  $\mu$ m). En el recuadro se observa la foto de la metafase utilizada.

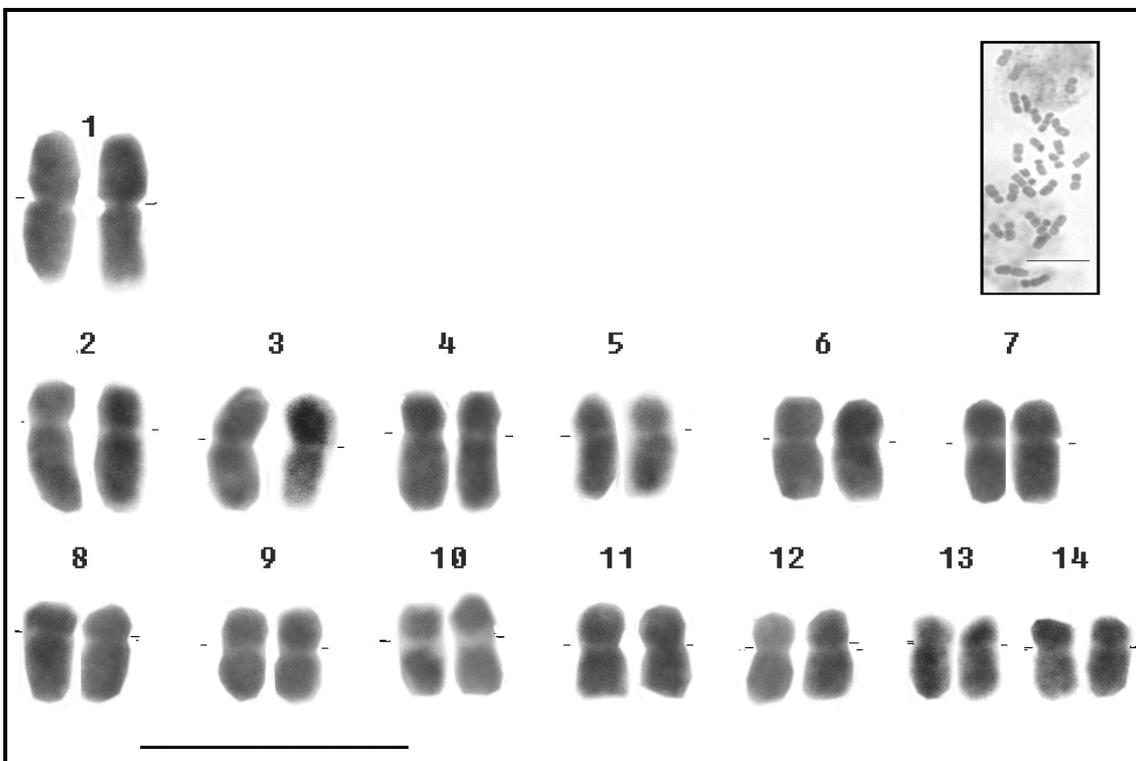
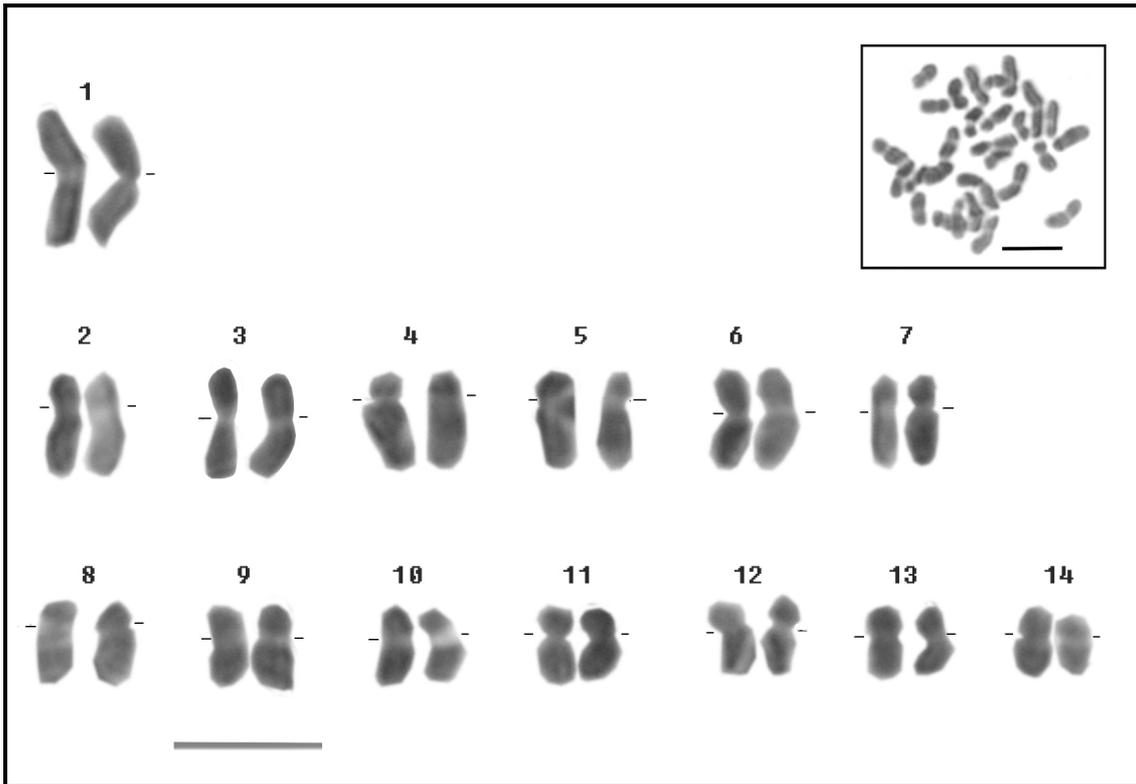


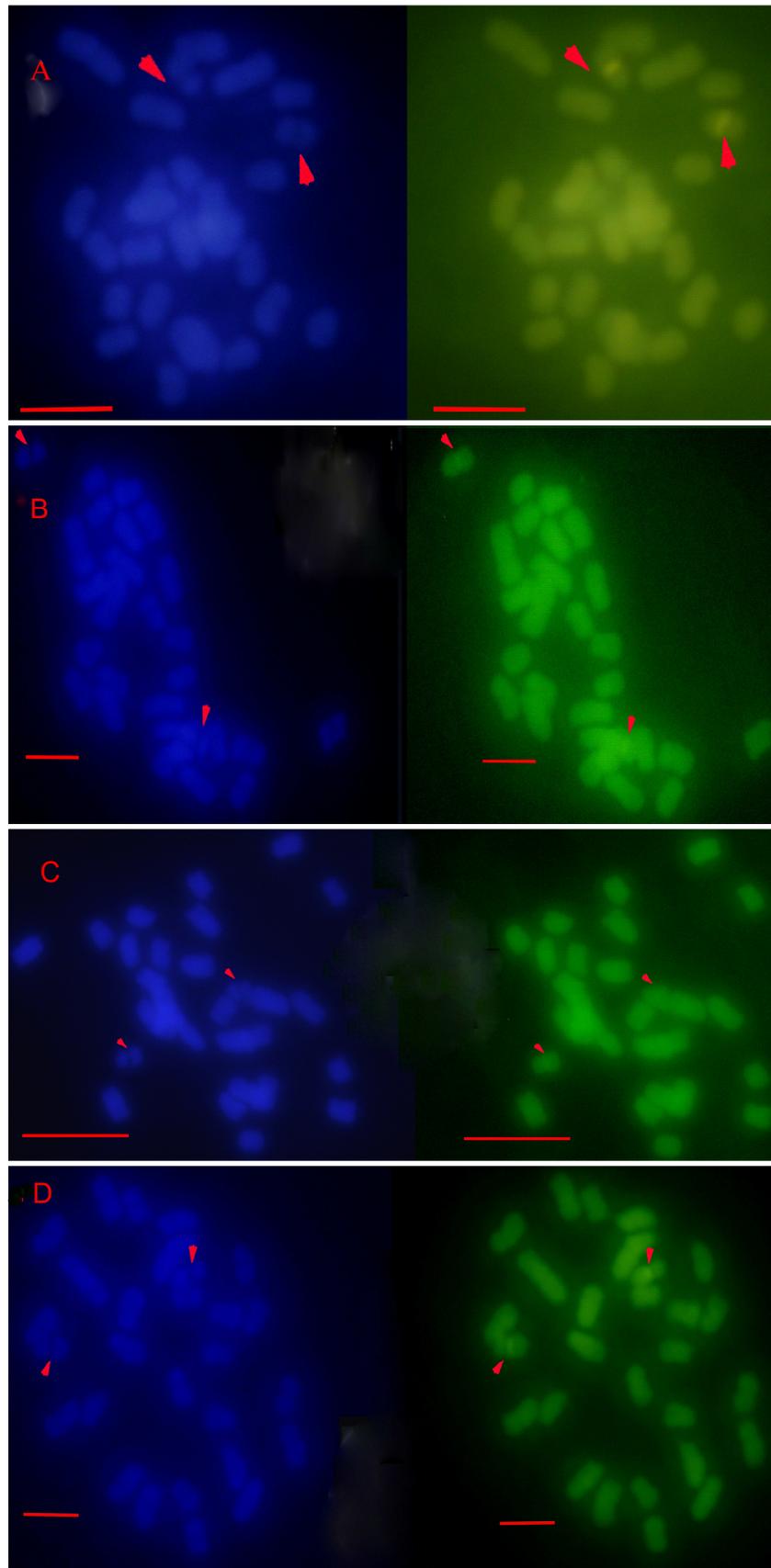
FIGURA 14: Cariotipo de *Achyrocline* sp. biotipo "de la piedra" (escala de 10  $\mu$ m). En el recuadro se observa la foto de la metafase utilizada.



**FIGURA 15:** Cariotipo de *Achyrocline* sp. biotipo "costera" (escala de 5  $\mu$ m). En el recuadro se observa la foto de la metafase utilizada.

### 4.3 Análisis comparativo por bandeo con CMA3/DAPI

Se analizaron las tres especies de marcela y el biotipo "de la piedra" mediante bandeo diferencial por doble tinción con los fluorocromos CMA3/DAPI. El patrón de tinción observado para todos los individuos analizados fue similar, observándose una banda DAPI negativa en la región pericentromérica del par cromosómico 10, que coincide con una banda CMA3 positiva en la misma región (Figura 16).



**FIGURA 16:** Contratinción CMA (derecha), DAPI (izquierda). A- *A. satyroides* (escala 5  $\mu\text{m}$ ); B- *A. flaccida* (esc. 5  $\mu\text{m}$ ); C- *A. alata* (esc. 10  $\mu\text{m}$ ); D- *A. sp. "de la piedra"* (esc. 5  $\mu\text{m}$ ). Las puntas de las flechas indican bandas CMA positivas y bandas DAPI negativas en las respectivas fotografías.

#### 4.4 Contenido de ADN

Para la cuantificación del contenido de ADN de las especies *A. saturoioides*, *A. flaccida*, *A. alata*, y de los biotipos *A. sp.* "de la piedra" y *A. sp.* "costera", se seleccionó la especie *Pisum sativum* como estándar. El análisis estadístico aplicado permitió identificar dos grupos. El grupo a integrado por *A. saturoioides*, *A. flaccida*, *A. sp.* "de la piedra" y *A. sp.* "costera", con una cantidad de ADN promedio de 5,711 picogramos por núcleo, que corresponde a 5585,4 Mbp (1 pg = 978 Mbp) (44). Por otro lado, *A. alata* presentó un contenido promedio de ADN de 6,033 picogramos (5900,3 Mbp). Como tiene una diferencia estadísticamente válida con el resto, conforma el grupo b (Tabla 7). En el Anexo VI se muestra la base de datos sobre la cual se trabajó.

**TABLA 7:** Contenido de ADN nuclear por citometría de flujo (valor 2C). Se muestran los dos agrupamientos que surgen del test de Tukey ( $P < 0.01$ ) para las distintas especies y biotipos de marcelas.

<b>Especie</b>	<b>Valor 2C en pg</b>	<b>Grupo</b>
<i>A. flaccida</i>	5,731386185	<b>a</b>
<i>A. saturoioides</i>	5,728909969	<b>a</b>
<i>A. sp.</i> "de la piedra"	5,706250191	<b>a</b>
<i>A. sp.</i> "costera"	5,677959442	<b>a</b>
<i>A. alata</i>	6,033135414	<b>b</b>

## 5. DISCUSIÓN

---

## 5.1 Conservación de los cariotipos en las marcelas

El número cromosómico de  $2n = 28$  obtenido en este estudio para todos los ejemplares del género *Achyrocline* analizados, *A. satureioides*, *A. flaccida*, *A. alata*, *A. sp.* "de la piedra" y *A. sp.* "costera", coincide con los resultados publicados por otros autores para individuos pertenecientes a *A. satureioides* originarios de Colombia y Argentina (32, 33), a *A. alata* de Ecuador y Perú (35, 36, 37) y a *A. trianae* de Ecuador (36). Sin embargo en un trabajo publicado para poblaciones de *A. satureioides* de Río Grande do Sul se plantea un número cromosómico de  $2n = 26$ , pero los propios autores comentan que tuvieron dificultades importantes para disgregar los cromosomas de manera que consideran que sería necesario repetir el análisis utilizando nuevos protocolos (34). No se encontró en la literatura información sobre número cromosómico en *Achyrocline flaccida*, de manera que este estudio presenta los primeros datos para esta especie. Una situación similar se plantea para la denominada en este trabajo *A. sp.* biotipo "costera", recientemente determinada como *Achyrocline crassiuscula* (Malme) Deble & Marchior (M. Bonifacino com. pers.), ya que para esta especie, distribuida también en Río Grande do Sul, este es el primer recuento de número cromosómico.

Aunque restan aún por estudiar muchas especies sudamericanas que es donde se encuentra la mayor diversidad de este género, y faltan datos para especies centroamericanas, africanas y de Madagascar, los resultados de este estudio sumados a los de los autores anteriormente mencionados indicarían que el género mantiene el número cromosómico básico ( $x = 14$ ) planteado para la tribu Gnaphalieae, a la que pertenece el género

*Achyrocline*, si bien en la misma existe una amplia variedad de números cromosómicos básicos y niveles de ploidía (31).

Al analizar los cariotipos realizados de las tres especies y dos biotipos, se concluye que, con las técnicas utilizadas, no existen grandes diferencias entre los mismos, las pequeñas variaciones detectadas entre algunos pares cromosómicos se consideran debidas a diferencias en el grado de condensación. Son todas poblaciones diploides, con 14 pares cromosómicos de morfología metacéntrica (m) o submetacéntrica (sm), y de tamaño mediano o pequeño. La estructura general de los cariotipos es en gradiente. Los 14 pares cromosómicos presentan heteropicnosis negativa a nivel centromérico. El par 10 muestra además una zona heteropicnótica negativa en la región pericentromérica, lo que permite su fácil identificación. Esta homogeneidad cariotípica contrasta con lo observado en la subtribu y tribu a las que pertenece este género, donde se detectó gran diversidad de cariotipos tanto a nivel de número cromosómico como se mencionó anteriormente, como a nivel morfológico, con cariotipos unimodales y bimodales (31, 29). En la familia Asteraceae, para la cual se plantea que el número básico es de  $x = 9$ , existen muchas tribus con números básicos y estructuras cariotípicas diferentes debido a la ocurrencia de procesos evolutivos como rearrreglos, disploidía y poliploidía (29).

Los datos obtenidos en este trabajo, comparados con la variabilidad presente en la familia, sugieren un proceso de especiación reciente dentro del género *Achyrocline* en esta región, que no ha originado aún cambios detectables a nivel cariológico.

## 5.2 Regiones heterocromáticas y de cistrones ribosomales

En las tres especies y el biotipo “de la piedra” analizados mediante bandeado diferencial por doble tinción con los fluorocromos CMA3/DAPI, los patrones de tinción observados son similares y consisten en una banda DAPI negativa CMA positiva en la región pericentromérica del brazo largo en el par cromosómico 10. La obtención de esta única banda CMA3 positiva DAPI negativa sugiere la presencia en esa región de heterocromatina asociada a NORs (38). Recientemente se analizaron las mismas accesiones aquí trabajadas con la técnica de FISH y se determinó la presencia de genes ribosomales en esta misma región para *A. flaccida*, *A. alata* y *A. sp.* “de la piedra” (P. Gaiero y M. Vaio, com. pers.). Se utilizaron sondas de ADN ribosomal 45S y 5S, aisladas de *Arabidopsis thaliana* y *Lotus japonicus* respectivamente, las cuales colocalizaron en la región de la banda CMA+/DAPI-. Siguiendo el patrón observado es de esperar que también se observe colocalización en *A. saturoioides* y en el biotipo “costera”.

En plantas es típica la localización en loci separados de los ADNr 5S y 45S, sin embargo en algunas angiospermas y gimnospermas se localizan ligados completamente en un mismo locus (45, 46, 47, 48). Dentro de las Asteráceas se ha encontrado colocalización en especies de la misma subfamilia Asteroideae que integra *Achyrocline*. Este es el caso de ejemplares pertenecientes a los géneros *Artemisia*, *Ajania* y *Chrysanthemum*, de la tribu Anthemideae, así como al género *Helychrisum* de la misma tribu a la que pertenece *Achyrocline* (49, 50, 51).

La causa de la colocalización en el género *Artemisia*, es la inserción de la secuencia conservada del gen ribosomal 5S próximo al final del gen ribosomal 26S, este posee las características estructurales de un gen funcional. Además existe una segunda inserción cadena abajo de otro gen ribosomal 5S, el cual presenta una delección en el promotor interno, lo que sugiere que se trate de un pseudogen. Asimismo, se plantea que dicha inserción también tiene lugar en el género *Helychrisum*, lo que hace suponer que este evento tuvo lugar antes de la separación de estas tribus (50). Estos datos permiten inferir que un patrón de inserción similar podría ser la causa de la colocalización en el género *Achyrocline*. Por otro lado, se observa que para tribus muy próximas a Gnaphalieae y Anthemideae esta característica aún no ha sido encontrada (50, 52). De la misma manera, tampoco se ha detectado colocalización en las especies estudiadas pertenecientes a las tribus Heliantheae y Senecioneae, también pertenecientes a la subfamilia Asteroideae, pero no se descarta su existencia en otras tribus de esta subfamilia (53, 50). En la Figura 18 se muestra un esquema de la filogenia de la familia Asteraceae indicando la presencia (+) o ausencia (-) del ligamiento entre los genes ribosomales 35S y 5S (50).

El estudio de la localización de los genes ribosomales es muy utilizado para inferir relaciones evolutivas entre especies e incluso dentro de las mismas debido a su gran variabilidad en número y posición, sobretodo del cluster 45S (54). De manera que la ausencia de variación entre las especies estudiadas *A. flaccida*, *A. sp.* "de la piedra", *A. alata*, si bien falta el análisis para *A. satureioides* y *A. sp.* "costera", aporta otro dato a la teoría de un

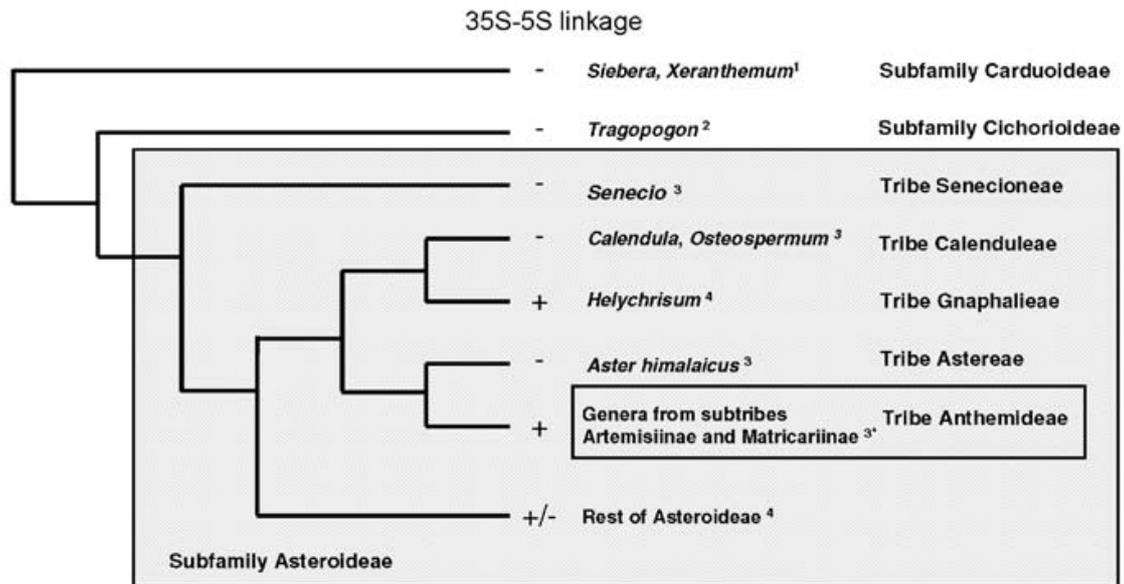


FIGURA 18: Esquema de la filogenia de las Asteráceas indicando con el símbolo + la presencia del ligamiento entre los genes ribosomales 35S y 5S, y con - la ausencia del ligamiento. Extraído de García *et al.*, 2008 (47).

proceso de especiación reciente en el género *Achyrocline*. Por otro lado, análisis preliminares de secuenciación de regiones entre ARNt cloroplásticas denominadas trng5-trng3 y C-F para *A. satureioides*, *A. flaccida* y *A. alata*, no han mostrado ninguna diferencia de nucleótidos entre las especies, lo que da soporte a la teoría planteada (P. Speranza com. pers.).

### 5.3 Distinción de especies por contenido de ADN

El análisis de contenido de ADN nuclear otorga la primera característica distintiva, ya que sugiere un distanciamiento de *A. alata* del grupo conformado por *A. satureioides*, *A. flaccida* y los biotipos “de la piedra” y “costera”, lo que coincide con lo esperado al observar las características morfológicas tan particulares de la primera. Este aumento en el contenido de ADN se debería a una mayor, aunque pequeña, cantidad de ADN repetido, que no es apreciado a nivel cariotípico. Como se está ante especies y biotipos diploides, el contenido de ADN por

genomio sería en cada caso de: 3,017 pg para *A. alata*, 2,866 pg para *A. flaccida*, 2,865 pg para *A. satureioides*, 2,853 pg para *A. sp.* “de la piedra” y 2,839 para *A. sp.* “costera”.

La revisión bibliográfica indica que dentro de la subfamilia Asteroideae existen datos sobre el contenido de ADN para especies pertenecientes a las tribus Senecioneae y Anthemideae. En la tribu Senecioneae se estudiaron 40 especies del género *Senecio*, de las cuales se desconoce mayoritariamente el número cromosómico. Los valores máximos y mínimos reportados para esta tribu son de  $2C = 52,3$  pg y  $2C = 3,5$  pg respectivamente, con gran variabilidad entre los mismos (55). En tanto que para la tribu Anthemideae se han analizado ejemplares pertenecientes a 12 géneros dentro de distintas subtribus, siendo el género *Artemisia* estudiado en mayor profundidad (55, 56, 57). Este género presenta dos números cromosómicos básicos,  $x = 8$  y  $x = 9$ , y tiene una elevada proporción de especies poliplodes (57). El contenido de ADN nuclear dentro del género es muy variado, el valor superior reportado es de  $2C = 25,65$  pg, en tanto que el inferior es de 3,50 pg. Se publicó además, la media de contenido de ADN por juego cromosómico básico para cinco subgéneros, las cuales son respectivamente de 4.088, 3.892, 3.563, 3.050 y 2.668 pg. En *Achyrocline*, los valores estimados por genomio básico para las cinco materiales analizados en este trabajo, coinciden con los valores menores de contenido de ADN del género *Artemisia*. Si se tiene en cuenta que los cinco materiales nativos de Uruguay estudiados tienen un número de cromosomas básico de 14, y en *Artemisia* son de 8 o 9, se debe concluir que por cromosoma hay menor contenido de ADN en nuestros materiales.

Uruguay es parte de uno de los dos centros de diversidad de la tribu Gnaphalieae a la que pertenece el género *Achyrocline*. Sin embargo los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis de que es un género de reciente diversificación. Por taxonomía clásica *A. alata* se separa claramente del resto, y esto lo refleja también, los análisis de contenido de ADN. Todas presentan gran homogeneidad en número cromosómico, estructura de cariotipos, tamaños de los pares cromosómicos, y especialmente en la conservación, para los cuatro materiales analizados, de la localización de la región CMA3+/DAPI-, que coincide en tres materiales con la colocalización de cistrones ribosomales 5S y 45S.

#### 5.4 Variación en la germinación

Los resultados de las pruebas de germinación realizadas en este trabajo con el objetivo de obtener meristema radicular para preparaciones citológicas, proporcionan los primeros reportes de porcentaje de germinación para *A. alata* y los dos biotipos, y aportan nuevos datos para *A. satureioides* y *A. flaccida*.

El porcentaje de germinación obtenido para *Achyrocline satureioides* es inferior al encontrado en la literatura para estudios realizados en base a el mismo protocolo de germinación, con valores de 41 % y 56 %, respectivamente. Esta disminución puede deberse a que en el presente trabajo se utilizó una muestra con un tiempo de almacenamiento algo más prolongado, y se sabe que el porcentaje de germinación para esta especie disminuye con el tiempo de almacenamiento (38). Otra hipótesis sería que dicha disminución se diera por diferencia en la madurez de las semillas al momento de la recolección, como se plantea en un estudio llevado a cabo en Uruguay, en el cual se encuentran diferencias en

el porcentaje de germinación entre muestras de *A. satureioides* procedentes diferentes orígenes con valores de 50 % y 82 % (58). Otros protocolos de germinación con resultados similares a los descritos anteriormente se encuentran en la literatura (59), de manera que los resultados de este trabajo son inferiores a los obtenidos para esta especie con varios protocolos.

*Achyrocline flaccida* fue la que produjo los mayores porcentajes en este estudio, sin observarse grandes variaciones entre muestras con diferente tiempo de almacenamiento, incluso en muestras almacenadas por 12 meses. Los valores obtenidos se aproximan a resultados previos para esta especie (60).

El biotipo *A. sp* “de la piedra” mostró al igual que *A. satureioides* un descenso en la viabilidad de las semillas a lo largo del tiempo, si bien estos son datos preliminares. En tanto no se obtuvieron buenos porcentajes de germinación para *A. alata* y el biotipo *A. sp* “costera”. Una razón puede ser que las condiciones a las cuales fueron expuestas las semillas, tanto durante el almacenamiento como al momento de la germinación, no fueran las adecuadas para la fisiología de las mismas, lo que estaría marcando una diferencia con el resto de las especies y biotipos. También se debe considerar que la madurez de las mismas al momento de la recolección no fuera la adecuada. En ambos casos se deberían repetir las pruebas con nuevas muestras y protocolos de almacenamiento y germinación.

## CONCLUSIONES

---

➤ Los análisis citogenéticos realizados en las especies de marcela nativas de Uruguay: *Achyrocline satureioides*, *A. flaccida*, *A. alata* y los biotipos *A. sp.* “de la piedra” y *A. sp.* “costera”, mostraron que todas son diploides de 28 cromosomas, metacéntricos o submetacéntricos, con estructura de sus cariotipos en gradiente, y cromosomas de medianos a pequeños.

➤ En todas las especies y en el biotipo *A. sp.* “de la piedra” se detectó como DAPI negativa y CMA3 positiva la región pericentromérica del par cromosómico 10. Dicha región presentan colocación de ADN ribosomal 5S y 45S en los materiales estudiados que son: *A. alata*, *A. flaccida* y *A. sp.* “de la piedra”.

➤ Los análisis de contenido de ADN separan a *A. alata* del resto de las especies y biotipos, las que conforman un grupo con gran homogeneidad.

➤ Los resultados de este trabajo sugieren que *Achyrocline* es un género de reciente diversificación. Conservan gran homogeneidad en número cromosómico, estructura de cariotipos, tamaños de los pares cromosómicos, y especialmente en la conservación de la localización de la región CMA3+/DAPI-. Sin embargo, morfológicamente *A. alata* se separa claramente del resto y esto lo refleja también el análisis de contenido de ADN.

# BIBLIOGRAFÍA

---

1. **FERRARO, G. & MARTINO, V.** 1990. Las Plantas de la Medicina Folklórica Argentina como Fuente de Nuevos Medicamentos. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 9 (3): 197-202.
2. **SALDIVIA, M. & BANDONI, A.** 1987. Plantas Medicinales: Antecedentes para su Normalización en Argentina. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 6 (3): 195-206.
3. **NAJERA, M.** 1983. La Herboristería en la República Argentina. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 2 (1): 55-9.
4. **INIA.** 2004. Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas. Serie Técnica FPTA-INIA número 11. Ed. Davies, P. Uruguay, 229 pp.
5. **GIANGUALANI, R.N.** 1976. Las Especies Argentinas del Género *Achyrocline* (Compositae). *Darwiniana*, 20: 549-576.
6. **PETENATTI, E., NIEVAS, C., PETENETTI, M. & DEL VITTO, L.** 2004. Medicamentos Herbarios en el Centro-oeste Argentino, IV. "Marcelas" y "Vira-viras" en Muestras Comerciales. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23 (4): 484-491.
7. **BREMER, K.** 1994. *Asteraceae: Cladistics and Classification*. Timber Press, Portland, Oregon, 752 pp.
8. **BURKART, A.** 1974. Flora Ilustrada de Entre Ríos (Argentina). Dicotiledoneas Metaclamídeas (Gamopétalas): Rubiales, Cucurbitales, Campanéales (incluso Compuestas). Colección Científica del INTA, VI., Buenos Aires, Argentina, 554 pp.
9. **BAYER, J.R., PUTTOCK, C.F. & KELCHNER, S.A.** 2000. Phylogeny of South African Gnaphalieae (Asteraceae) based on two non-coding chloroplast sequences. *American Journal of Botany*, 87 (2): 259-272.
10. **BAYER, J.R. & STARR J.R.** 1998. Tribal Phylogeny of the Asteraceae Based on Two Non-Coding Chloroplast Sequences, the trnL Intron and trnL/trnF Intergenic Spacer. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 85 (2): 242-256.
11. **KIM, K-J. & JANSEN, R.K.** 1995. ndhF sequence evolution and the major clades in the sunflower family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (22): 10379-10383.

12. **FUNK, V.A., BAYER, R.J., KEELEY, S., CHAN, R., WATSON, L., GEMEINHOLZER, B., SCHILLING, E., PANERO, J.L., BALDWIN, B.G., GARCIA-JACAS, N., SUSANNA, A. & JANSEN, R.K.** 2005. Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. *Biol. Skr.*, 55: 343-374.
13. **KIM, K-J., CHOI, K-S. & JANSEN, R.K.** 2005. Two Chloroplast DNA Inversions Originated Simultaneously During the Early Evolution of the Sunflower Family (Asteraceae). *Mol. Biol. Evol.*, 22 (9): 1783-1792.
14. **ANDERBERG, A.A.** 1994. Tribe Gnaphalieae. In: *Asteraceae: Cladistics & Classification*. Timber Press, Portland, Oregon. 304-364 pp. Ed. K. Bremer.
15. **DILLON, M.O. & SAGÁSTEGUI, A.** 1991. Sinopsis de los géneros de Gnaphaliinae (Asteraceae-Inuleae) de Sudamérica. *Arnaldia*, 1 (2): 5-91. Cit. por Paz Deble, L. 2007. O gênero *Achyrocline* (Less.) DC. (Asteraceae: Gnaphalieae) do Brasil. Tesis de Doctorado, Universidad de Santa María, Rio Grande do Sul, Brasil, 134 pp.
16. **PAZ DEBLE, L.** 2007. O gênero *Achyrocline* (Less.) DC. (Asteraceae: Gnaphalieae) do Brasil. Tesis de Doctorado, Universidad de Santa María, Rio Grande do Sul, Brasil, 134 pp.
17. **HEGNAUER, R.** 1977. The Chemistry of the Compositae. In: *The Biology and Chemistry of the Compositae*. Academic Press, London, 1: 238-335. Eds. Heywood V.H., Harbone J. B. & Turner T. L. Cit. por Amat A.G. 1983. Taxones de Compuestas Bonaerenses críticas para la investigación farmacológica. *Acta Farm. Bonaerense*, 2 (1): 23-36.
18. **DELLACASSA, E., LORENZO, D. & PAZ, D.** 2004. Caracterización fisicoquímica de los aceites esenciales. In: INIA. Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas. Serie Técnica FPTA-INIA número 11. Cap. 10: 159-167. Ed. P. Davies.
19. **BROUSSALIS, A., FERRARO, G., GRUÑÍ, A. & COUSSIO, J.** 1989. Aspectos Fotoquímicos de Especies Argentinas del Género *Achyrocline*. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 8 (1): 11-16.
20. **MARTINEZ-FLÓRES, S., GONZÁLEZ-GALLEGO, J., CULEBRAS, J. M. & TUÑON, M. J.** 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, XVII (6): 271-278.
21. **SIMOES, C.M., SCHENKEL, E.P., BAUER, L & LANGELOH, A.** 1988. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC. Compositae. *J. Ethnopharmacol*, 22 (3): 281-293.
22. **KADARIAN, C., BROUSSALIS, A. M., MIÑO, J., LOPEZ, P., GORZALCZANY, S., FERRARO, G., ACEVEDO, C.** 2002.

- Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Pharmacological Research, 45 (1): 56-61.
23. CALVO, D., CARIDDI, L.N., GROSSO, M., DEMO, M.S. & MALDONADO, A.M. 2006. *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC (Marcela): Antimicrobial activity on *Staphylococcus* spp. and immunomodulating effects on human lymphocytes. Revista Latinoamericana de Microbiología, 48 (3-4): 247-255.
  24. MORQUIO, A., RIVERA-MEGRET, F. & DAJAS, F. 2005. Photoprotection by topical application of *Achyrocline satureioides* ('Marcela'). Phytother Res., 19 (6): 486-490.
  25. GUTKIND, G.O., MARTINO, V., GRAÑA, N., COUSSIO, J.D. & DE TORRES, R.A. 1981. Screening of South American plants for biological activities. 1. Antibacterial and antifungal activity. Fitoterapia, 52: 213-218. Cit. por INIA. 2004. Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas, Serie Técnica FPTA-INIA número 11. Ed. P. Davies. 229 pp.
  26. GUTKIND, G.O., NORBEDO, C., MOLLERACH, M., FERRARO, G., COUSSIO, J.D. & DE TORRES, R.A. 1984. Antibacterial activity of *Achyrocline flaccida*. Ethnopharmacol, 10: 319-321. Cit. por INIA. 2004. Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas, Serie Técnica FPTA-INIA número 11. Ed. P. Davies. 229 pp.
  27. FERRARO, G., BROUSSALIS, A., MARTINO, V. & GARCIA, G. 1992. Argentine medicinal plants: antiviral screening. Acta Horticulturae 306: 239-244.
  28. MORQUIO, A., FERREIRA, M., ARREDONDO, F., BLASINA, F., ECHEVERRY, C., ABIN, J.A. & DAJAS, F. 2004. Estudio comparativo de compuestos polifenólicos, actividad citoprotectora y antioxidante en especies autóctonas del género *Achyrocline*. In: INIA. Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas. Serie Técnica FPTA-INIA número 11. Cap. 11: 169-178. Ed. P. Davies.
  29. WATANABE, K., YAHARA, T., HASHIMOTO, G., NAGATANI, Y., SOEJIMA, A., KAWAHARA, T. & NAKAZAWA, M. 2007. Chromosome numbers and karyotypes in Asteraceae. Annals of the Missouri Botanical Garden, 94: 643-654.
  30. SOLBRIG, O.T. 1977. Chromosomal cytology and evolution in the family Compositae. In: The biology and chemistry of the Compositae. Academic Press, London. 1: 26-281. Eds. Heywood V.H., Harborne J.B. & Turner B.L. Cit. por Watanabe, K., Yaharat., Hashimoto, G., Nagatani, Y., Soejima, A., Kawahara., T. & Nakazawa, M. 2007. Chromosome numbers and karyotypes in Asteraceae. Annals of the Missouri Botanical Garden, 94: 643-654.

31. WATANABE, K., SHORT, P.S., DENDA, T., KONISHI, N., ITO, M. & KOSUGE, K. 1999. Chromosome Numbers and Karyotypes in the Australian Gnaphalieae and Plucheeae (Asteraceae). *Australian Systematic Botany*, 12: 781-802.
32. JANSEN, R.K., STUESSY, T.F., DÍAZ-PIEDRAHÍTA, S. & FUNK, V.A. 1984. Recuentos cromosómicos en Compositae de Colombia. *Caldasia*, 14 (66): 7–20.
33. HUNZIKER, J.H., ESCOBAR, A., XIFRED, C.C. & GAMERRO, J.C. 1990. Estudios cariológicos en Compositae. VI. Darwiniana, 30: 115–121.
34. PEREIRA DE PEREIRA, L., da LUZ, L.P., BOSIO TEDESCO, S. & FERREIRA da SILVA, A.C. 2006. Número de cromossomos em populações de *Achyrocline satureioides* Lam. (marcela) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciencia Rural*. 36 (2): 678-681.
35. JANSEN, R.K. & STUESSY, T.F. 1980. Chromosome counts of compositae from Latin America. *American Journal of Botany*, 76: 585-594.
36. CARR, G.D., KING, R.M., POWELL, A.M. & ROBINSON, H. 1999. Chromosome numbers in Compositae. *American Journal of Botany* XVIII 86 (7): 1003–1013.
37. TURNER, B.L., POWELL A.M. & CUATRECASAS, J. 1967. Chromosome Numbers in Compositae. XI. Peruvian Species. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 54 (2): 172-177.
38. IKUTA, A.R.Y. & BARROS, B.I.I. 1996. Influência da temperatura e da luz sobre a germinação de Marcela (*Achyrocline satureioides*). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 31 (12): 859-862.
39. GUERRA, M. & SOUZA, M.J. 2002. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ed. FUNPEC, Ribeirão Preto, Brasil. 131pp.
40. LEVAN, A., FREDGA, K. & SANDBERG, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52 (29): 201-220.
41. SCHWEZER, D. & AMBROS, P.F. 1994. Chromosome Banding. In: J. R. Gosden Ed., *Methods in molecular biology*, vol.29, Chromosome analysis protocols. Humana Press, Totowa, 97-113.
42. DOLEŽEL, J. & GÖDHE, W. 1995. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry* 19 (2): 103-106.

43. **GUERRA, M.** 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology*, 23 (4): 1029-1041.
44. **DOLEŽEL, J., BARTOŠ, J., VOGLMAYR, H. & GREILHUBER, J.** 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry*, 51: 127-128.
45. **MURAVENKO, O.V., AMOSOVA, A.V., SAMATADZE, T.E., SEMENOVA, O.Y., NOSOVA, I.V., POPOV, K.V., SHOSTAK, N.G., ZOSCHUK, S.A. & ZELENIN, A.V.** 2004. Chromosome Localization of 5S and 45S Ribosomal DNA in the Genomes of *Linum* L. Species of the Section *Linum* (Syn. *Protolinum* and *Adenolinum*). *Russ J Genet* 40 (2): 193-196.
46. **SIROKY, J., LYSAK, M.A., DOLEZEL, J., KEJNOVSKY, E. & VYSKOT, B.** 2001. Heterogeneity of rDNA distribution and genome size in *Silene* spp. *Chromosome Res* 9 (5): 387-393.
47. **NAKAO, Y., TAIRA, T., HORIUCHI, S., KENJI, K. & MUKAI, Y.** 2005. Chromosomal difference between male and female trees of *Ginkgo biloba* examined by karyotype analysis and mapping of rDNA on the chromosomes by fluorescence in situ hybridisation. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 74 (4): 275-280.
48. **MURRAY, B.G., FRIESEN, N. & HESLOP-HARRISON, J.S.** 2002. Molecular cytogenetic analysis of *Podocarpus* and comparison with other gymnosperm species. *Annals Bot.* 89: 483-489.
49. **PELLICER, J., GARCIA, S., GARNATJE, T., HIDALGO, O., SILJAK-YAKOVLEV, S. & VALLÈS, J.** 2008. Molecular cytogenetic characterization of some representatives of the subgenera *Artemisia* and *Absinthium* (genus *Artemisia*, Asteraceae). *Collectanea Botanica* (Barcelona), 27: 19-27.
50. **GARCIA, S., LIM, K.Y., CHESTER, M., GARNATJE, T., PELLICER, J., VALLÈS, J., LEITCH, A.R. & KOVAŘÍK, A.** 2009. Linkage of 35S and 5S rRNA genes in *Artemisia* (family Asteraceae): first evidence from angiosperms. *Chromosoma*, 118 (1): 85-97.
51. **ABD EL-TWAB, M. H. & KONDO, K.** 2006. FISH physical mapping of 5S, 45S and Arabidopsis-type telomere sequence repeats in *Chrysanthemum zawadskii* showing intra-chromosomal variation and complexity in nature. *Chrom. Bot.* 1: 1-5.
52. **VAIO, M., MAZZELLA, C., RODRÍGUEZ, M., LÓPEZ-CARRO, B., SANTIÑAQUE, F., CARROCIO, I., DÍAZ, C., PEREIRA, J., BONIFACINO, M., SPERANZA, P. & FOLLE, G.** 2008. Análisis cromosómicos, isoenzimáticos y de contenido de ADN en carquejas y marcelas. *Anales de las I Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Genética*, Montevideo, 61p.

53. CUÉLLAR, T., ORELLANA, J., BELHASSEN, E. & BELLA, J.L. 1999. Chromosomal characterization and physical mapping of the 5S and the 18S-5.8S-25S ribosomal DNA in *Helianthus argophyllus*, with new data from *Helianthus annuus*. *Genome*, 42: 110-115.
54. GUERRA, M. 2004. FISH. Conceitos e Aplicações na Citogenética. Ed. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, Brasil. 176 pp.
55. ZONNEVELD, B.J.M., LEITCH, I.J. & BENNETT, M.D. 2005. First Nuclear DNA Amounts in more than 300 Angiosperms. *Annals of Botany*, 96 (2): 229-244.
56. TORRELL, M. & VALLÈS, J. 2001. Genome size in 21 *Artemisia* L. species (Asteraceae, Anthemideae): Systematic, evolutionary, and ecological implications. *Genome*, 44: 231-238.
57. GARCIA, S., SANZ, M., GARNATJE, T., KREITSCHITZ, A., MCARTHUR, E.D. & VALLÈS, J. 2004. Variation of DNA amount in 47 populations of the subtribe Artemisiinae and related taxa (Asteraceae, Anthemideae): karyological, ecological, and systematic implications. *Genome*, 47: 1004-1014.
58. DAVIES, P. 1993. An advance on the propagation of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Compositae). *Acta Hort. (ISHS)* 331: 237-244.
59. ROLANDO, R., SERDIUK, I., SUÁREZ, D. & DARRÉ, C.A. 2004. Tasa de germinación y obtención de plantines de especies aromáticas y medicinales de la provincia de Córdoba (República Argentina). *Dominguezia*, 20 (1): 12-16.
60. DAVIES, P. 1999. Experimentation on the cultivation of *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC and *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC in Uruguay. *Acta Hort. (ISHS)* 502: 59-66.

## ANEXO I

**TABLA 8:** Listado de los especímenes herborizados pertenecientes a los biotipos *A. sp.* “de la piedra”, *A. sp.* “costera”, y *A. sp.* “de hoja fina”, depositados en el Herbario “B. Rosengurtt” de Facultad de Agronomía (MVFA).

Nº herbario	Género	Biotipo	Lugar de Colecta	Fecha	Colectores
MVFA 22194	<i>Achyrocline</i>	costera	Rocha; R 10 , balneario El Caracol	1-3/04/1992	Davies
MVFA 21800	<i>Achyrocline</i>	costera	Rocha; al W de La Pedrera y del Barco Hundido	24/02/1993	Marchesi
MVFA 21800	<i>Achyrocline</i>	costera	Rocha; entre Costa Azul y La Pedrera	14/03/1996	Marchasi
MVFA 23036	<i>Achyrocline</i>	hoja fina	Durazno; R 6 Km 196	23/02/1994	Brescia, Marchesi, Mujica
MVFA 23365	<i>Achyrocline</i>	hoja fina	Florida; R 41 Km 34.5	05/04/1994	Davies, Motta
MVFA 22213	<i>Achyrocline</i>	hoja fina	Tacuarembó; bajada hacia la Gruta de los Helechos	1-3/04/1992	Davies
MVFA 23012	<i>Achyrocline</i>	hoja fina	Durazno; R 6 a aprox 15 Km de estancia Los Naranjos	25/02/1994	Brescia, Marchesi, Mujica
MVFA 27599	<i>Achyrocline</i>	hoja fina	Durazno; R 6 Km 280, Cerrezuelo, 32° 49'48" S, 55° 23'17" W	16/01/1998	Grela, González, Jaurena
1116	<i>Achyrocline</i>	hoja fina	Rocha; balneario San Antonio al este de La Pedrera	30/03/2004	Bonifacino, Speroni
MVFA 23403	<i>Achyrocline</i>	hoja fina	Tacuarembó; R 9 Km 9.5	07/04/1994	Davies, Motta
MVFA 25306	<i>Achyrocline</i>	de la piedra	Río Negro; Algorta , Campo Echebarne	19/12/1995	Marchesi, Vignare
MVFA 25877	<i>Achyrocline</i>	de la piedra	Maldonado; Cerro de las Animas	27/10/1995	Bonifacino, Mendez
5496	<i>Achyrocline</i>	de la piedra	Lavalleja; Minas, Cerro del Penitente	11/01/1909	Berro
MVFA 12759	<i>Achyrocline</i>	de la piedra	Canelones; La Paz	28/03/1976	Marchesi
MVFA 28044	<i>Achyrocline</i>	de la piedra	San José; sierra Mahoma	05/02/1998	Marchesi, Grela, González, Jaurena
MVFA 22216	<i>Achyrocline</i>	de la piedra	Tacuarembó; bajada hacia la gruta de los Helechos	1-3/04/1992	Davies
MVFA 28874	<i>Achyrocline</i>	de la piedra	Maldonado; sierra de las Animas, Cerro Tupambaé	01/04/1999	Bonifacino
548	<i>Achyrocline</i>	de la piedra	Maldonado; Cerro Pan de Azúcar	04/11/1956	Arrillaga

## ANEXO II

**TABLA 9:** Base de datos completa de todas las colectas de especies y biotipos de *Achyrocline* realizadas.

<b>Id</b>	<b>Género</b>	<b>Especie</b>	<b>Origen</b>	<b>GPS</b>	<b>Fecha</b>	<b>Colectores</b>
A01	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Maldonado, R60 Km 29	34°37'05"S 55°15'07"O	13/02/2007	Vaio M, Speranza P
A02	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	Canelones, Ruta Interbalnearia Km 58, bañados de Guazubirá	34°45'15.23"S 55°36'29.06"O	23/02/2007	Vaio M, Speranza P
A03	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Canelones, Ruta Interbalnearia Km 58, bañados de Guazubirá	34°45'15.23"S 55°36'29.06"O	23/02/2007	Vaio M, Speranza P
A04	<i>Achyrocline</i>	sp. "de la piedra"	Maldonado, R109 después bifurcación hacia cerro Cordillera	34°20'29"S 54°37'43"O	23/02/2007	Vaio M, Speranza P
A05	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	Cerro Largo, Cañitas,	32°19'45"S 53° 51'48" O	15/04/2007	M Vaio
A06	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Canelones, Pinar, R Rep Argentina frente manzana G solar 12	34°47'53.65"S 55°52'51.35"O	28/05/2007	Mazzella, Rodríguez M, Vaio M
A07	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Canelones, Pinar, R Rep Argentina frente manzana G solar 12	34°47'53.65"S 55°52'51.35"O	28/05/2007	Mazzella, Rodríguez M, Vaio M
A08	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Canelones, Pinar, R Rep Argentina cuadras manzana G solar 12	34°47'51.75"S 55°52'44.76"O	28/05/2007	Mazzella, Rodríguez M, Vaio M
A09	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Canelones, Pinar, R Rep Argentina cuadras manzana G solar 12	34°47'51.75"S 55°52'44.76"O	28/05/2007	Mazzella, Rodríguez M, Vaio M
A10	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Canelones, Pinar, R Rep Argentina cuadras manzana G solar 12	34°47'51.75"S 55°52'44.76"O	28/05/2007	Mazzella, Rodríguez M, Vaio M
A11	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia	34°45'15.23"S 55°36'29.06"O	28/05/2007	Mazzella, Rodríguez M, Vaio M
A12	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia	34°45'15.23"S 55°36'29.06"O	28/05/2007	Mazzella, Rodríguez M, Vaio M
A13	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia	34°45'15.23"S 55°36'29.06"O	28/05/2007	Mazzella, Rodríguez M, Vaio M
A14	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	Maldonado, Cerro de los Burros (Playa Hermosa)	34°49'15.27"S 55°18'0.98"O	28/05/2007	Mazzella, Rodríguez M, Vaio M
A15	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Maldonado, Cerro de los Burros (Playa Hermosa)	34°49'15.27"S 55°18'0.98"O	28/05/2007	Mazzella, Rodríguez M, Vaio M
A16	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	Maldonado, Cerro de los Burros (Playa Hermosa)	34°49'15.27"S 55°18'0.98"O	28/05/2007	Mazzella, Rodríguez M, Vaio M
A17	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	Maldonado, Cerro de los Burros (Playa Hermosa)	34°49'15.27"S 55°18'0.98"O	28/05/2007	Mazzella, Rodríguez M, Vaio M
A18	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	Maldonado, Cerro de los Burros (Playa Hermosa)	34°49'15.27"S 55°18'0.98"O	28/05/2007	Mazzella, Rodríguez M, Vaio M
A19	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	San José		29/05/2007	Lerena R.
A20	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Maldonado, Ruta 12 Km 26,	34°39'46"S 55°02'47"O	19/06/2007	Mazzella, Vaio M
A21	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Maldonado, Ruta 12 Km 26	34°39'46"S 55°02'47"O	19/06/2007	Mazzella, Vaio M
A22	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Maldonado, Ruta 12 Parada Cerro Dos Hermanos,	34°34'36"S 55°04'36"O	19/06/2007	Mazzella, Vaio M
A23	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Maldonado, Ruta 12 Parada Cerro Dos Hermanos	34°34'36"S 55°04'36"O	19/06/2007	Mazzella, Vaio M
A24	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Canelones, Pinar, R Rep Argentina, manzana G solar 12	34°47'53.65"S 55°52'51.35"O	22/06/2007	Gaiero P
A25	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Canelones, Pinar, R Rep Argentina, manzana G solar 12	34°47'53.65"S 55°52'51.35"O	22/06/2007	Gaiero P

Continuación de TABLA 9.

<b>Id</b>	<b>Género</b>	<b>Especie</b>	<b>Origen</b>	<b>Fecha</b>	<b>Colectores</b>
A 26	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Maldonado, Borde del Arroyo Maldonado	34°54'42.44"S 54°52'35.18"O	18/07/2007 Mazzella C
A27	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	Salto, Ruta 3 Km 503.5	31°24'0.17"S 57°55'0.20"O	26/08/2007 Rodríguez M
A28	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	Salto, Ruta 3 Km 503.5	31°24'0.17"S 57°55'0.20"O	26/08/2007 Rodríguez M
A29	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	Salto, Ruta 3 Km 503.5	31°24'0.17"S 57°55'0.20"O	26/08/2007 Rodríguez M
A30	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	Salto, Ruta 3 Km 503.5	31°24'0.17"S 57°55'0.20"O	26/08/2007 Rodríguez M
A31	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	Salto, Ruta 3 Km 503.5	31°24'0.17"S 57°55'0.20"O	26/08/2007 Rodríguez M
A32	<i>Achyrocline</i>	<i>sp.</i>	Maldonado, R109 después bifurcación hacia cerro Cordillera	34°20'29"S 54°37'43"O	23/02/2007 Vaio M, Speranza P
A33	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	Maldonado, Cerro San Antonio	34°52'40.91"S 55°16'23.20"O	16/11/2007 Speranza P
A34	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	San José		14/11/2007 Lerena R
A35	<i>Achyrocline</i>	<i>sp. "de la piedra"</i>	San José, Sierra de Mahoma,	34° 07'14.8"S 56° 57'47.8"O	06/11/2007 Vaio M
A36	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	San José, Sierra de Mahoma,	34° 07'14.8"S 56° 57'47.8"O	06/11/2007 Vaio M
A37	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	San José, Sierra de Mahoma,	34° 07'14.8"S 56° 57'47.8"O	06/11/2007 Vaio M
A38	<i>Achyrocline</i>	<i>sp. "de la piedra"</i>	San José, Sierra de Mahoma,	34° 07'14.8"S 56° 57'47.8"O	06/11/2007 Vaio M
A39	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Canelones, Cuchilla Alta,	34° 52'41"S 55° 16'2"O	13/12/2007 Carrocio I, Mazzella C, Rodriguez M, Vaio M
A40	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Maldonado, Ruta 10 Km 187.5,	34°48'39"S 54° 36'5"O	13/12/2007 Carrocio I, Mazzella C, Rodriguez M, Vaio M
A41	<i>Achyrocline</i>	<i>sp. "de la piedra"</i>	Maldonado, Ruta 60 Km 21,	34°42'18"S 55°14'07"O	13/12/2007 Carrocio I, Mazzella C, Rodriguez M, Vaio M
A42	<i>Achyrocline</i>	<i>sp. "de la piedra"</i>	Maldonado, Ruta 60 Km 27.5,	34°38'14"S 55°14'53"O	13/12/2007 Carrocio I, Mazzella C, Rodriguez M, Vaio M
A43	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Maldonado, Ruta 10 Km 187.5,	34°48'39"S 54°36'5"O	13/12/2007 Carrocio I, Mazzella C, Rodriguez M, Vaio M
A44	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Maldonado, Ruta 10 Km 187.5,	34°48'39"S 54° 36'5"O	13/12/2007 Carrocio I, Mazzella C, Rodriguez M, Vaio M
A45	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Maldonado. Ruta 60 Km 29,	34°37'05"S 55°15'07"O	13/12/2007 Carrocio I, Mazzella C, Rodriguez M, Vaio M
A46	<i>Achyrocline</i>	<i>sp. "de la piedra"</i>	Maldonado, Ruta 60 Km 30,	34°37'05"S 55°15'07"O	13/12/2007 Carrocio I, Mazzella C, Rodriguez M, Vaio M
A47	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Canelones, Cuchilla Alta,	34° 52'41"S 55° 16'2"O	13/12/2007 Carrocio I, Mazzella C, Rodriguez M, Vaio M
A48	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	Canelones, Toledo, Km 21,5		07/03/2008 Mazzella C, Gaiero P, Rodriguez M
A49	<i>Achyrocline</i>	<i>sp. "de la piedra"</i>	Lavalleja, Villa serrana, Ruta 8 Km 139	34°17'05.58"S 54°59'06.45"O	19/03/2008 Gaiero P
A50	<i>Achyrocline</i>	<i>sp. "de la piedra"</i>	Lavalleja, Villa serrana, Ruta 8 Km 139	34°17'05.58"S 54°59'06.45"O	19/03/2008 Gaiero P
A51	<i>Achyrocline</i>	<i>sp. "de la piedra"</i>	Lavalleja, Villa serrana, Ruta 8 Km 139	34°17'05.58"S 54°59'06.45"O	19/03/2008 Gaiero P
A52	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	Salto, ex ruta 3 esq Trillo	31°20'50.68"S 57°56'18.68"O	20/03/2008 Rodríguez M
A53	<i>Achyrocline</i>	<i>sp. "de la piedra"</i>	Maldonado, Ruta 60 Km 29	34°37'05"S 55°15'07"O	31/03/2008 Rodríguez M, Vaio M
A54	<i>Achyrocline</i>	<i>sp. "de la piedra"</i>	Maldonado, Ruta 60 Km 29	34°37'05"S 55°15'07"O	31/03/2008 Rodríguez M, Vaio M
A55	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Maldonado, Ruta 60 Km 29	34°37'05"S 55°15'07"O	31/03/2008 Rodríguez M, Vaio M

Continuación de TABLA 9.

<b>Id</b>	<b>Género</b>	<b>Especie</b>	<b>Origen</b>	<b>Fecha</b>	<b>Colectores</b>
A56	<i>Achyrocline</i>	sp. "de la piedra"	Maldonado, Ruta 60 Km 29	34°37'05"S 55°15'07"O	31/03/2008 Rodríguez M, Vaio M
A57	<i>Achyrocline</i>	sp. "de la piedra"	Maldonado, Ruta 60 Km 29	34°37'05"S 55°15'07"O	31/03/2008 Rodríguez M, Vaio M
A58	<i>Achyrocline</i>	sp. "de la piedra"	Lavalleja, Salto del Penitente	34°22'58" S 55°04'27"O	14/04/2008 Vaio M
A59	<i>Achyrocline</i>	sp. "de la piedra"	Lavalleja, Salto del Penitente	34°22'58" S 55°04'27"O	14/04/2008 Vaio M
A60	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Lavalleja, Salto del Penitente	34°22'58" S 55°04'27"O	14/04/2008 Vaio M
A61	<i>Achyrocline</i>	sp. "de la piedra"	Lavalleja, Salto del Penitente	34°22'58" S 55°04'27"O	14/04/2008 Vaio M
A62	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Lavalleja, Salto del Penitente	34°22'58" S 55°04'27"O	14/04/2008 Vaio M
A63	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	Salto, Rodó esquina Trillo	31°20'43.74"S 57°55'50.64"O	20/03/2008 Rodríguez M
A64	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	Salto, Parque del Lago	31°16'32.04"S 57°54'52.47"O	20/03/2008 Rodríguez M
A65	<i>Achyrocline</i>	sp. "de la piedra"	Maldonado, Ruta 60 Km 29	34°37'05"S 55°15'07"O	31/03/2008 Rodríguez M, Vaio M
A66	<i>Achyrocline</i>	sp. "de la piedra"	Maldonado, Ruta 60 Km 29	34°37'05"S 55°15'07"O	31/03/2008 Rodríguez M, Vaio M
A67	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	Paysandú, Ruta 90, Pueblo Orgoroso	32°23'08.4"S 57°31'02.9"O	15/05/2008 Gaiero P, Marchesi E, Vaio M
A68	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	Paysandú, Ruta 90, Pueblo Orgoroso,	32°23'08.4"S 57°31'02.9"O	15/05/2008 Gaiero P, Marchesi E, Vaio M
A69	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia	34°45'15.23"S 55°36'29.06"O	19/05/2008 Mazzella C, Rodriguez M
A70	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia	34°45'15.23"S 55°36'29.06"O	19/05/2008 Mazzella C, Rodriguez M
A71	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia	34°45'15.23"S 55°36'29.06"O	19/05/2008 Mazzella C, Rodriguez M
A72	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia	34°45'15.23"S 55°36'29.06"O	19/05/2008 Mazzella C, Rodriguez M
A73	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia	34°45'15.23"S 55°36'29.06"O	19/05/2008 Mazzella C, Rodriguez M
A74	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Rocha, orilla de Laguna Garzón	34°48'3.27"S 54°34'1.17"O	19/05/2008 Mazzella C
A75	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia	34°45'15.23"S 55°36'29.06"O	19/05/2008 Mazzella C, Rodriguez M
A76	<i>Achyrocline</i>	sp. "costera"	Rocha, orilla de Laguna Garzón	34°48'3.27"S 54°34'1.17"O	25/05/2008 Mazzella C
A77	<i>Achyrocline</i>	sp. "costera"	Rocha, orilla de Laguna Garzón	34°48'3.27"S 54°34'1.17"O	25/05/2008 Mazzella C
A78	<i>Achyrocline</i>	sp. "costera"	Rocha, orilla de Laguna Garzón	34°48'3.27"S 54°34'1.17"O	25/05/2008 Mazzella C
A79	<i>Achyrocline</i>	sp. "costera"	Rocha, orilla de Laguna Garzón	34°48'3.27"S 54°34'1.17"O	25/05/2008 Mazzella C
A80	<i>Achyrocline</i>	sp. "costera"	Rocha, orilla de Laguna Garzón	34°48'3.27"S 54°34'1.17"O	25/05/2008 Mazzella C
A81	<i>Achyrocline</i>	sp. "costera"	Rocha, orilla de Laguna Garzón	34°48'3.27"S 54°34'1.17"O	25/05/2008 Mazzella C
A82	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	Salto, ex ruta 3 esq Trillo	31°20'50.68"S 57°56'18.68"O	25/08/2008 Rodriguez M,
A83	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia	34°45'15.23"S 55°36'29.06"O	19/05/2008 Mazzella C, Rodriguez M
A84	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia	34°45'15.23"S 55°36'29.06"O	19/05/2008 Mazzella C, Rodriguez M
A85	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	Rocha, entrada Camping Punta Rubia	34°34'57.01"S 54° 7'49.76"O	22/09/2008 Speranza P

Continuación de TABLA 9.

<b>Id</b>	<b>Género</b>	<b>Especie</b>	<b>Origen</b>		<b>Fecha</b>	<b>Colectores</b>
A86	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Rocha, entrada Camping Punta Rubia	34°34'57.01"S 54° 7'49.76"O	22/09/2008	Speranza P
A87	<i>Achyrocline</i>	sp. "costera"	Rocha, entrada Camping Punta Rubia	34°34'57.01"S 54° 7'49.76"O	22/09/2008	Speranza P
A89	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia	34°45'15.23"S 55°36'29.06"O	19/05/2008	Mazzella C, Rodriguez M
A90	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia	34°45'15.23"S 55°36'29.06"O	19/05/2008	Mazzella C, Rodriguez M
A91	<i>Achyrocline</i>	sp. "de la piedra"	Rivera, cerro del Miriñaque	31° 32'00.8"S 55° 37' 58.3"O	26/10/2008	Mazzella C, Gaiero P
A92	<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	Rivera, cerro del Miriñaque	31° 32'00.8"S 55° 37' 58.3"O	26/10/2008	Mazzella C, Gaiero P
A93	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia	34°45'15.23"S 55°36'29.06"O	19/05/2008	Mazzella C, Rodriguez M
A94	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia	34°45'15.23"S 55°36'29.06"O	19/05/2008	Mazzella C, Rodriguez M
A95	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	Canelones, Guazubirá nuevo, Km58 R Interbanearia	34°45'15.23"S 55°36'29.06"O	19/05/2008	Mazzella C, Rodriguez M
A96	<i>Achyrocline</i>	sp. "costera"	Maldonado, a 6mts de Laguna Garzón	34°48'5.72"S 54°34'25.52"O	19/10/2008	Mazzella C
A97	<i>Achyrocline</i>	sp. "costera"	Maldonado, a 6mts de Laguna Garzón	34°48'5.72"S 54°34'25.52"O	19/10/2008	Mazzella C
A98	<i>Achyrocline</i>	sp. "costera"	Maldonado, a 6mts de Laguna Garzón	34°48'5.72"S 54°34'25.52"O	19/10/2008	Mazzella C

## ANEXO III

**TABLA 10:** Listado del material vegetal herborizado en este trabajo.

Género	Especie	Id	Origen	GPS	Fecha	Colectores
<i>Achyrocline</i>	sp. "de la piedra"	N1	Maldonado, R109 después bifurcación hacia cerro Cordillera	34°20'29"S 54°37'43"O	23/02/2007	Vaio M, Speranza P
<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	N2	Maldonado, Cerro San Antonio	34°52'40.91"S 55°16'23.20"O	16/11/2007	Speranza P
<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	N3	Maldonado, Cerro San Antonio	34°52'40.91"S 55°16'23.20"O	16/11/2007	Speranza P
<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	N4	Maldonado, R12 Km 26	34°39'46"S 55°02'47"O	19/12/2006	Mazzella C, Vaio M
<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	N5	Maldonado, R12 Km 26	34°39'46"S 55°02'47"O	19/12/2006	Mazzella C, Vaio M
<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	N6	Maldonado, R12 Km 26	34°39'46"S 55°02'47"O	19/12/2006	Mazzella C, Vaio M
<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	N7	Maldonado, R12 Km 40		19/12/2006	Mazzella C, Vaio M
<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	N8	Maldonado, R12, entre cerro Dos Hermanos	34°34'36"S 55°04'36"O	19/12/2006	Mazzella C, Vaio M
<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	N9	Maldonado, R12 Km 40		19/12/2006	Mazzella C, Vaio M
<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	N10	Maldonado, R109 después bifurcación hacia cerro Cordillera	34°20'29"S 54°37'43"O	23/02/2007	Vaio M, Speranza P
<i>Achyrocline</i>	sp. "de la piedra"	N11	Maldonado, R109 después bifurcación hacia cerro Cordillera	34°20'29"S 54°37'43"O	23/02/2007	Vaio M, Speranza P
<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	N12	Canelones, R Interbalnearia Km 58, baños de Guazubirá	34°45'15.23"S 55°36'29.06"O	23/02/2007	Vaio M, Speranza P
<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	N13	San José, desconocido		14/11/2007	Ing. Agr. Lerena
<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	N14	Canelones, R Interbalnearia Km 58, baños de Guazubirá	34°45'15.23"S 55°36'29.06"O	28/05/2007	Mazzella C, Rodríguez M, Vaio M
<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	N15	Maldonado, Cerro de los Burros	34°49'15.27"S 55°18'0.98"O	28/05/2007	Mazzella C, Rodríguez M, Vaio M
<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	N16	Maldonado, Cerro de los Burros	34°49'15.27"S 55°18'0.98"O	28/05/2007	Mazzella C, Rodríguez M, Vaio M
<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	N17	Maldonado, Cerro de los Burros	34°49'15.27"S 55°18'0.98"O	28/05/2007	Mazzella C, Rodríguez M, Vaio M
<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	N18	Canelones, Pinar, R República Argentina frente manzana G solar 12	34°47'53.65"S 55°52'51.35"O	28/05/2007	Mazzella C, Rodríguez M, Vaio M
<i>Achyrocline</i>	<i>satureioides</i>	N19	Canelones, Pinar, R República Argentina frente manzana G solar 12	34°47'53.65"S 55°52'51.35"O	28/05/2007	Mazzella C, Rodríguez M, Vaio M
<i>Achyrocline</i>	sp. "costera"	N20	Maldonado, 6 mts. de la Laguna Garzón	34°48'5.72"S 54°34'25.52"O	25/05/2008	Mazzella C
<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	N21	Canelones, R Interbalnearia Km 58, baños de Guazubirá	34°45'15.23"S 55°36'29.06"O	25/05/2008	Mazzella C
<i>Achyrocline</i>	sp. "de la piedra"	N22	Maldonado, R60 Km 20	34°42' 19"S 55°14'07"O	06/11/2006	Mazzella C, Vaio M, González A, Folle G
<i>Achyrocline</i>	sp. "de la piedra"	N23	Lavalleja, salto del penitente	34°22'58" S 55°04'27"O	11/11/2008	Rodríguez M

## ANEXO IV

---

### Digestión de puntas de raíz:

#### Solución A:

- 3,2 g de Celulasa Calbiochem (*Aspergillus niger*, polvo seco)
- 0,8 g de Celulasa Onozuka RS (Yakult Pharmaceutical)
- 3,8 ml de Pectinasa (*Aspergillus niger*, solución en glicerol 40%, Sigma)
- 92,2 ml de Tampón x1

#### Solución B:

- 0,8 g de Celulasa Calbiochem
- 0,2 g de Celulasa Onozuka
- 1,9 ml de Pectinasa
- 97,1 ml de Tampón x1

#### Tampón x10:

- Ácido Cítrico 40 mM
- Citrato de Sodio 60 mM
- Ajustar pH a 4,8
- Diluir 1:10 en agua, para usar

## ANEXO V

**TABLA 11:** Índices de Levan, r e lc, para cada par cromosómico, indicando para cada especie o biotipo las repeticiones realizadas.

		Par 1	Par 2	Par 3	Par 4	Par 5	Par 6	Par 7	Par 8	Par 9	Par 10	Par 11	Par 12	Par 13	Par 14
<b><i>A. saturoioides</i></b>															
A44	r	1,18	2,31	1,12	2,46	2,79	1,05	1,83	2,24	1,10	1,40	1,61	1,23	1,65	1,33
	lc	45,81	30,24	47,07	28,93	26,39	48,87	35,32	30,90	47,52	41,70	38,28	44,88	37,74	42,97
		m	sm	m	sm	sm	m	sm	sm	m	m	m	m	m	m
A73	r	1,15	1,90	1,29	2,08	2,83	1,15	1,89	2,47	1,48	1,06	1,48	1,63	1,52	1,37
	lc	46,62	34,45	43,64	32,46	26,13	46,55	34,55	28,82	40,37	48,61	40,39	38,02	39,69	42,12
		m	sm	m	sm	sm	m	sm	sm	m	m	m	m	m	m
A74	r	1,27	2,56	1,26	1,92	1,94	1,36	1,95	2,96	1,42	1,50	1,47	1,48	1,25	1,37
	lc	44,08	28,10	44,16	34,21	34,05	42,44	33,94	25,28	41,31	40,06	40,42	40,27	44,38	42,26
		m	sm	m	sm	sm	m	sm	sm	m	m	m	m	m	m
<b><i>A. flaccida</i></b>															
A29	r	1,35	2,22	1,30	2,33	1,70	1,61	1,97	2,32	1,25	1,53	1,50	1,64	1,55	1,30
	lc	42,60	31,05	43,57	30,01	37,03	38,26	33,67	30,10	44,43	39,54	39,92	37,93	39,15	43,57
		m	sm	m	sm	sm	m	sm	sm	m	m	m	m	m	m
A28	r	1,35	1,76	1,37	2,49	2,18	1,02	1,71	2,67	1,24	1,24	1,46	1,23	1,41	1,07
	lc	42,57	36,24	42,27	28,65	31,43	49,46	36,85	27,26	44,73	44,69	40,71	44,88	41,52	48,28
		m	sm	m	sm	sm	m	sm	sm	m	m	m	m	m	m
A67	r	1,34	2,27	1,30	2,47	2,20	1,34	1,86	1,84	1,15	1,31	1,53	1,35	1,27	1,16
	lc	42,79	30,59	43,53	28,79	31,23	42,68	34,92	35,25	46,42	43,23	39,59	42,54	44,13	46,25
		m	sm	m	sm	sm	m	sm	sm	m	m	m	m	m	m

Continuación de TABLA 11.

		Par 1	Par 2	Par 3	Par 4	Par 5	Par 6	Par 7	Par 8	Par 9	Par 10	Par 11	Par 12	Par 13	Par 14
<b><i>A. alata</i></b>															
A69	r	1,19	1,87	1,25	1,74	2,10	1,45	1,86	2,48	1,38	1,50	1,30	1,18	1,36	1,40
	lc	45,69	34,85	44,45	36,43	32,22	40,80	34,93	28,72	41,97	40,04	43,49	45,95	42,44	41,74
		m	sm	m	sm	sm	m	sm	sm	m	m	m	m	m	m
A70	r	1,23	2,70	1,37	1,95	2,04	1,48	1,92	2,08	1,61	1,32	1,53	1,40	1,23	1,46
	lc	44,94	27,05	42,19	33,86	32,88	40,35	34,26	32,45	38,29	43,11	39,53	41,63	44,74	40,61
		m	sm	m	sm	sm	m	sm	sm	m	m	m	m	m	m
A90	r	1,35	2,35	1,53	2,05	2,34	1,55	2,03	2,11	1,46	1,55	1,42	1,64	1,68	1,09
	lc	42,64	29,85	39,52	32,77	29,95	39,27	33,04	32,18	40,71	39,24	41,28	37,90	37,28	47,83
		m	sm	m	sm	sm	m	sm	sm	m	m	m	m	sm	m
<b><i>A. sp. "de la piedra"</i></b>															
A04	r	1,24	2,98	1,16	2,78	2,02	1,15	1,79	2,24	1,57	1,36	1,60	1,61	1,46	1,30
	lc	44,55	25,10	46,32	26,45	33,10	46,57	35,80	30,87	38,91	42,34	38,53	38,26	40,71	43,39
		m	sm	m	sm	sm	m	sm	sm	m	m	m	m	m	m
A45	r	1,22	2,39	1,26	2,02	2,00	1,56	1,74	2,16	1,45	1,40	1,14	1,64	1,63	1,51
	lc	45,01	29,47	44,29	33,12	33,29	39,06	36,53	31,66	40,89	41,67	46,74	37,94	38,00	39,83
		m	sm	m	sm	sm	m	sm	sm	m	m	m	m	m	m
A65	r	1,14	2,27	1,21	2,71	1,96	1,45	2,10	1,76	1,56	1,42	1,26	1,25	1,67	1,37
	lc	46,78	30,60	45,18	26,97	33,78	40,77	32,29	36,24	39,08	41,37	44,30	44,50	37,51	42,18
		m	sm	m	sm	sm	m	sm	sm	m	m	m	m	m	m
<b><i>A. sp. "costera"</i></b>															
A77	r	1,09	2,56	1,37	2,80	2,60	1,30	2,22	2,38	1,34	1,44	1,52	1,64	1,22	1,25
	lc	47,83	28,05	42,12	26,29	27,78	43,42	31,03	29,60	42,79	41,00	39,63	37,82	45,06	44,37
		m	sm	m	sm	sm	m	sm	sm	m	m	m	m	m	m

## ANEXO VI

**TABLA 12:** Datos de contenido nuclear de ADN obtenidos por citometría de flujo para ejemplares pertenecientes a *A. saturoioides*, *A. flaccida*, *A. alata*, *A. sp.* “de la piedra” y *A. sp.* “costera”, indicando las repeticiones realizadas a cada muestra.

Accesión	Género	Especie	XSt	Xmstra	Xmuestra/XSt	DNA content	CVst	Cvmstra	%CVst	%CVm	Estándar
A12	<i>Achyrocline</i>	<i>saturoioides</i>	539,58	338,74	0,627784573	5,70656177	3,72	5,33	0,689425108	1,573478184	<i>Pisum</i>
A12	<i>Achyrocline</i>	<i>saturoioides</i>	602,84	379,89	0,630167209	5,728219926	2,41	4,01	0,399774401	1,055568717	<i>Pisum</i>
A12	<i>Achyrocline</i>	<i>saturoioides</i>	311,41	195,28	0,627083266	5,700186892	2,28	4,17	0,732153752	2,13539533	<i>Pisum</i>
A23	<i>Achyrocline</i>	<i>saturoioides</i>	487,93	308,39	0,632037382	5,745219806	3,46	4,61	0,709118111	1,494860404	<i>Pisum</i>
A23	<i>Achyrocline</i>	<i>saturoioides</i>	321,39	204,85	0,637387598	5,793853262	2,83	4,67	0,88055011	2,279716866	<i>Pisum</i>
A23	<i>Achyrocline</i>	<i>saturoioides</i>	314,88	196,53	0,62414253	5,673455602	2,35	4,18	0,746316057	2,126901745	<i>Pisum</i>
A75	<i>Achyrocline</i>	<i>saturoioides</i>	320,32	201,74	0,629807692	5,724951923	3,09	4,64	0,96466034	2,299990086	<i>Pisum</i>
A75	<i>Achyrocline</i>	<i>saturoioides</i>	338,45	214,94	0,63507165	5,7728013	2,86	4,43	0,845028808	2,06104029	<i>Pisum</i>
A75	<i>Achyrocline</i>	<i>saturoioides</i>	321,43	202,76	0,630806085	5,734027315	4,02	4,9	1,250661108	2,416650227	<i>Pisum</i>
A14	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	467,11	296,81	0,635417782	5,775947635	3,66	6,16	0,78354135	2,075401772	<i>Pisum</i>
A14	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	721,94	454,21	0,629152007	5,718991744	3,06	3,51	0,423857938	0,772770304	<i>Pisum</i>
A14	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	456,38	289,73	0,634843771	5,770729874	3,84	5,02	0,841404093	1,732647637	<i>Pisum</i>
A14	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	410,21	259,6	0,632846591	5,75257551	2,28	3,46	0,555812876	1,332819723	<i>Pisum</i>
A14	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	534,57	333,77	0,62437099	5,675532297	1,96	3,47	0,366649831	1,039638074	<i>Pisum</i>
A29	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	606,58	384,15	0,633304758	5,756740249	3,05	3,39	0,502819084	0,882467786	<i>Pisum</i>
A29	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	375,23	239,27	0,637662234	5,796349706	1,98	2,57	0,527676359	1,074100389	<i>Pisum</i>
A29	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	335,32	208,51	0,621823929	5,652379518	3,07	4,3	0,915543362	2,062251211	<i>Pisum</i>
A30	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	493,18	313,06	0,634778377	5,770135448	1,92	3,09	0,389310191	0,98703124	<i>Pisum</i>
A30	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	624,51	395,3	0,632976253	5,753754143	2,39	3,5	0,382700037	0,885403491	<i>Pisum</i>
A30	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	619,9	390,67	0,630214551	5,728650266	2,36	4,12	0,380706566	1,05459851	<i>Pisum</i>
A67	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	321,97	202,72	0,629623878	5,723281051	3,38	4,33	1,049787247	2,135951066	<i>Pisum</i>
A67	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	322,34	200,24	0,621207421	5,646775454	3,1	3,99	0,961717441	1,992608869	<i>Pisum</i>
A67	<i>Achyrocline</i>	<i>flaccida</i>	306,22	192,75	0,629449415	5,721695186	2,51	4,53	0,819672131	2,350194553	<i>Pisum</i>

Continuación de TABLA 12.

Accesión	Género	Especie	XSt	Xmstra	Xmuestra/XSt	DNA content	CVst	Cvmstra	%CVst	%CVm	Estándar
A13	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	594,69	393,08	0,660983033	6,008335772	2,2	2,66	0,369940641	0,676707032	<i>Pisum</i>
A13	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	572,59	382,07	0,667266281	6,065450497	2,76	4,05	0,482020294	1,06001518	<i>Pisum</i>
A13	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	615,13	410,22	0,666883423	6,061970315	2,96	3,36	0,481199096	0,819072693	<i>Pisum</i>
A13	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	536,92	359,11	0,668833346	6,079695113	3,37	4,59	0,627654027	1,278159895	<i>Pisum</i>
A69	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	491,42	329,28	0,670058199	6,090829026	1,79	2,27	0,364250539	0,689382896	<i>Pisum</i>
A69	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	305,95	205,45	0,671514953	6,104070927	1,88	1,88	0,61447949	0,915064493	<i>Pisum</i>
A69	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	305,66	197,53	0,646240921	5,874329974	2,98	3,73	0,974939475	1,888320761	<i>Pisum</i>
A70	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	499,2	336,15	0,673377404	6,121000601	1,28	1,77	0,256410256	0,526550647	<i>Pisum</i>
A70	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	298,96	198,99	0,665607439	6,050371622	2,25	2,95	0,752609045	1,482486557	<i>Pisum</i>
A70	<i>Achyrocline</i>	<i>alata</i>	310,23	201,28	0,648808948	58,976733339	3,43	4,14	1,105631306	2,056836248	<i>Pisum</i>
A53	<i>Achyrocline</i>	de la piedra	352,46	221,01	0,627049878	5,699883391	2,93	4,44	0,831300006	2,008958871	<i>Pisum</i>
A53	<i>Achyrocline</i>	de la piedra	320,48	202,04	0,630429356	5,730602846	3,25	4,1	1,014103844	2,029301128	<i>Pisum</i>
A53	<i>Achyrocline</i>	de la piedra	345,97	216,33	0,625285429	5,683844553	3,83	4,9	1,107032402	2,265058013	<i>Pisum</i>
A45	<i>Achyrocline</i>	de la piedra	321,37	203,15	0,632137412	5,746129072	3,04	4,4	0,945950151	2,165887275	<i>Pisum</i>
A45	<i>Achyrocline</i>	de la piedra	315,25	198,97	0,631149881	5,737152419	2,72	3,93	0,862807296	1,975172137	<i>Pisum</i>
A54	<i>Achyrocline</i>	de la piedra	320,73	200,41	0,624855798	5,679939201	2,83	4,43	0,882362111	2,210468539	<i>Pisum</i>
A54	<i>Achyrocline</i>	de la piedra	330,42	204,89	0,620089583	5,636614309	2,44	3,4	0,738454089	1,65942701	<i>Pisum</i>
A54	<i>Achyrocline</i>	de la piedra	320,48	202,04	0,630429356	5,730602846	3,25	4,1	1,014103844	2,029301128	<i>Pisum</i>
A77	<i>Achyrocline</i>	costera	328,28	207,2	0,631168515	5,737321798	2,48	4,81	0,755452662	2,321428571	<i>Pisum</i>
A77	<i>Achyrocline</i>	costera	319,88	202,02	0,631549331	5,740783419	2,6	4,78	0,812804802	2,366102366	<i>Pisum</i>
A77	<i>Achyrocline</i>	costera	323,21	202,9	0,62776523	5,706385941	3,52	4,91	1,089075214	2,419911286	<i>Pisum</i>
A78	<i>Achyrocline</i>	costera	335,82	205,92	0,613185635	5,573857424	3,6	4,63	1,072002859	2,248445998	<i>Pisum</i>
A78	<i>Achyrocline</i>	costera	319,87	197,6	0,617750961	5,615356238	2,5	4,45	0,781567512	2,252024291	<i>Pisum</i>
A78	<i>Achyrocline</i>	costera	317,4	196,19	0,618115942	5,618673913	3,17	4,64	0,998739761	2,365054284	<i>Pisum</i>
A78	<i>Achyrocline</i>	costera	321,77	197,62	0,614165398	5,582763465	3,04	3,91	0,944774218	1,978544682	<i>Pisum</i>
A87	<i>Achyrocline</i>	costera	323,16	202,7	0,627243471	5,701643149	2,9	4,85	0,897388291	2,392698569	<i>Pisum</i>
A87	<i>Achyrocline</i>	costera	330,72	207,91	0,628658684	5,714507438	2,99	4,85	0,90408805	2,332740128	<i>Pisum</i>
A87	<i>Achyrocline</i>	costera	358,54	228,31	0,636776929	5,788302281	3,39	4,64	0,945501199	2,032324471	<i>Pisum</i>