

ISSN 2591-6653

Naturalia

Patagónica

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y CIENCIAS DE LA SALUD
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN BOSCO

VOLUMEN 15 (2019)



NATALIA PATAGONICA

Volumen 15 – 2019

Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud
Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

Director

Dr. Osvaldo León Córdoba

Secretaria de Redacción

Dra. María Luján Flores

Tesorera

Dra. Mabel Sandra Feijóo

Editor

Dr. Osvaldo León Córdoba

Comité Editor

Dra. Graciela Pinto Vitorino
Lic. María del Rosario Carballo
Dra. Nerina Iantanos
Dra. Mónica Casarosa
Dra. Ofelia Iris María Katusich

Evaluadores

Dra. Estela Lopretto
Dra. Marta Collantes
Dr. Gabriel Oliva
Dr. Juan Manuel Sayago
Ing. Agr. Antonio D.
Dalmasso
Dr. Leonardo Salgado
Dra. Laura Beatriz López
Dra. Mirta E. Valencia
Dra. María Elena Arce

Dra. Mirta Arriaga
Dra. Martha Gattuso
Dra. Susana Gattuso
Dra. Cristina de Villalobos
Dr. Carlos Arturo Stortz
Dr. Diego Pol
Dr. Daniel Delamo
Dra. Susana Gorzalczany
Dra. María Luján Flores

Lic. Gabriel M. Martin
Dra. Alicia Boraso
Dra. María Cecilia Rodríguez
Dra. Teresita Montenegro
Dra. María Cristina
Matulewicz
Dra. Ana María Giulietti
Dra. Isabel Moreno Castillo
Dra. Adriana Broussalis

EDITORIAL

Estimados lectores

Con esta publicación se realiza la entrega del Volumen 15 de nuestra revista *Naturalia Patagónica*, desde su relanzamiento en el año 2002. Este número incluye un trabajo de revisión, varios artículos originales y un trabajo de tesis realizado por docentes de nuestra Facultad.

Este número incluye un trabajo de revisión por invitación sobre una temática relacionada directamente con nuestra región. Es de esperar que los siguientes números de la revista contengan otros trabajos semejantes, lo cual resulta muy importante para dar a conocer al mundo científico, la experiencia y el conocimiento alcanzado a través de los años sobre un tema de la Patagonia Argentina.

Como siempre estamos a disposición de todas las consultas y/o sugerencias que los lectores y autores deseen hacernos llegar, esperando se traduzcan en beneficios para todos en su conjunto.

Agradecemos como con cada número, a la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, por el espacio en la web correspondiente.

Todos los números de nuestra revista se pueden descargar desde nuestra dirección web <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/naturalia>.

Confiamos en la buena receptividad de *Naturalia Patagónica* entre nuestros lectores habituales y entre los lectores en general, que se interesen por la problemática de las Ciencias Naturales y las Ciencias de la Salud especialmente en el ámbito de la región, invitando además a que se sumen autores regionales y de otras latitudes, enviando su producción científica para nuestro siguiente número.

Dirección, Secretaría y Comité Editorial

Foto de tapa: Coleóptero alimentándose de *A. boronioides* en el Saltillo,
Chubut. Dra. Silvia Beatriz González.

A la memoria de Omar Cesari. Q.E.P.D. (1942-2019)

El Geólogo Omar Cesari, docente e investigador ya jubilado de amplia y reconocida trayectoria en la carrera de Geología de nuestra Institución, se desempeñó como Decano de la Facultad de Ciencias Naturales. El Geólogo Cesari partió el pasado 30 de noviembre. Llegue a todos sus familiares, colegas, amigos y quienes compartieron momentos de su vida, nuestro sentido homenaje.

A la memoria de Alberto Cesar Ayape. Q.E.P.D. (1951-2019)

El Contador Alberto Cesar Ayape fue docente de la Facultad de Ciencias Económicas de nuestra Universidad desde su inicio en Comodoro Rivadavia. Se desempeñó además como Secretario de Extensión Universitaria, primero durante la gestión del Rector Jorge Gil desde 2005 a 2009, y luego en la gestión del Rector Adolfo Genini desde 2009 a 2013. Posteriormente se desempeñó como Rector de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco en el período 2013 a 2017.

El Contador Ayape partió el pasado 01 de diciembre dejando una huella enmarcada por su intenso programa de Extensión Universitaria. Llegue a todos sus familiares, colegas, amigos y quienes compartieron momentos de su vida, nuestro sentido homenaje.

Diciembre de 2019.

CONTENIDO

ARTICULOS DE REVISION

Aspectos que se entrelazan: interacciones ecológicas, coevolución y propiedades emergentes, en el estudio de la relación planta-insecto. Análisis con una especie aromática y medicinal nativa de la Patagonia *Adesmia boronioides* Hook. f. Silvia Beatriz González y Gabriel Martín..... 01-43

ARTICULOS CIENTIFICOS

Desarrollo embrionario y larval del erizo de mar verde *Arbacia dufresnii* (Echinodermata: Echinoidea). Jimena Pía Fernández, Lucía Epherra, Lucas Sepúlveda, Tamara Rubilar 44-58

Evaluación de la efectividad de manejo en las áreas protegidas costero marinas de la provincia del Chubut, Argentina. Ricardo R. Fondacaro, Ricardo Delfino Shenke, Guillermo Caille, Ana E. Ruiz 59-81

Arribazón de *Anotrichium furcellatum* (J. Agardh) Baldock (Ceramiales, Rhodophyta) en Bahía Engaño-Chubut-Argentina. Laura B. Pérez; Susana Perales; Norma H. Santinelli & Rodrigo Mansilla 82-93

¿La temperatura y la escala de cultivo son factores determinantes en la composición bioquímica y el perfil de ácidos grasos en microalgas? Rojas Quiroga María Laura, Avaro Marisa, Gittardi Agustín, Díaz de Vivar María Enriqueta, Soria Gaspar, Van der Molen Silvina 94-114

Caracterización fitoquímica y bioactividad de *Chuquiraga aurea* Skottsb. (Asteraceae). Analía Verónica Uhrich; Osvaldo León Córdoba; María Luján Flores 115-127

TESIS DE MAESTRIA DE DOCENTES E INVESTIGADORES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN BOSCO.

Plantas de la estepa patagónica tolerantes a la contaminación de derivados del petróleo. Tesista: Vivien Pentreath. Director: Dr. Fernando Pliego Alfaro, Co-Director: Mg. Susana G. Perales..... 123-135

CONTENTS

REVIEW

- Intertwining aspects: ecological interactions, coevolution and emergent properties in the study of plant-insect interactions. Analysis on *Adesmia boronioides* Hook. f. an aromatic and medicinal plant from Patagonia.** Silvia Beatriz González y Gabriel Martin 01-43

RESEARCH ARTICLES

- Embryonic and larval development of the green sea urchin of *Arbacia dufresnii* (Echinodermata: Echinoidea).** Jimena Pía Fernández, Lucía Epherra, Lucas Sepúlveda, Tamara Rubilar 44-58
- Evaluation of effectiveness of handling in the marine coastal protected areas of the province of Chubut, Argentina.** Ricardo R. Fondacaro, Ricardo Delfino Shenke, Guillermo Caille, Ana E. Ruiz 59-81
- Drift marine algae of *Anotrichium furcellatum* (J. Agardh) Baldock (Cerámiales, Rhodophyta) in Bahía Engaño-Chubut-Argentina.** Laura B. Pérez; Susana Perales; Norma H. Santinelli & Rodrigo Mansilla 82-93
- Are temperature and culture scale determinant factors in biochemical composition and fatty acid profile in microalgae?** Rojas Quiroga María Laura, Avaro Marisa, Gittardi Agustín, Díaz de Vivar María Enriqueta, Soria Gaspar, Van der Molen Silvina 94-114
- Phytochemical characterization and bioactivity of *Chuquiraga aurea* Skotts. (Asteraceae).** Analía Verónica Uhrich, Osvaldo León Córdoba, María Luján Flores 115-127

THESIS MASTHER DEGREE OF RESEARCH OF THE FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN BOSCO.

Patagonian steppe plants tolerant to oil derivative contamination. Thesis: Vivien Pentreath. Director: Dr. Fernando Pliego Alfaro, Co-director: Mg. Susana G. Perales 123-135

Review

Aspectos que se entrelazan: interacciones ecológicas, coevolución y propiedades emergentes, en el estudio de la relación planta-insecto. Análisis con una especie aromática y medicinal nativa de la Patagonia *Adesmia boronioides* Hook. f.

Intertwining aspects: ecological interactions, coevolution and emergent properties in the study of plant-insect interactions. Analysis on *Adesmia boronioides* Hook. f. an aromatic and medicinal plant from Patagonia

Dra. Silvia Beatriz González¹ y Dr. Gabriel Martín²

LIPAM (Laboratorio de Investigación de Plantas Aromáticas y Medicinales), Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, UNPSJB sede Esquel, silviaesquel@speedy.com.ar
Centro de Investigación Esquel de Montaña y Estepa Patagónica (CIEMEP), CONICET – UNPSJB.

RESUMEN

Adesmia boronioides, conocida como “paramela”, es una especie perteneciente a la familia Leguminosae, que crece en pampas y cerros en Patagonia, Sudamérica, y ha sido utilizada popularmente con fines medicinales, para una gran cantidad de afecciones desde dolores reumáticos, hasta malestares digestivos. Se han realizado estudios con el fin de profundizar en su potencial uso terapéutico con resultados promisorios como antiinflamatoria y antiparasitaria. Así mismo destaca por su actividad antioxidante y sus cualidades para la industria cosmética y perfumería. Se analizan en esta contribución la interacción planta-insecto de la especie, considerando numerosas variables: sus principales grupos fitoquímicos, taxa de insectos que la habitan, estación del año, estado fenológico, especies botánicas asociadas, altitud, latitud y clima, entre otros. Es difícil poder sacar conclusiones con tantos aspectos a tener en cuenta. Sin embargo, se ha intentado establecer algunos parámetros que influyen en la relación *Adesmia*/insectos, incluyendo muchos datos experimentales originales, realizados por los autores. Se discute el concepto de la coevolución planta/insecto por medio de dos ejemplos, que incluyen a dos especies de áfidos: *Aphis adesmiae* y *Uroleucon nahuelhuapense*, exclusivos de *A. boronioides*, y la interacción entre *A. bijuga* y un abejorro nativo, *Bombus dahlbomii*, nueve veces superior a los registrados para abejas y abejorros exóticos. Exactamente lo contrario sucede con *A. boronioides* y la exótica *Apis mellifera*, que no visita a esta planta nativa. Se postula la existencia de una propiedad

emergente de esta interacción: *el olor de la planta*, resultante de la presencia de cantidades importantes de compuestos volátiles, debido a que el aroma de una mezcla nunca puede predecirse a partir del olor de sus componentes individuales, un principio básico del arte y la ciencia de la perfumería. Es así como la interacción insecto-planta determina nuevas combinaciones y proporciones en los terpenoides volátiles y, en consecuencia, se generan variantes en el aroma de esta especie, que sin embargo mantiene en las diferentes poblaciones y épocas, cierta cualidad única, dulce, balsámica e intensa, que la caracteriza.

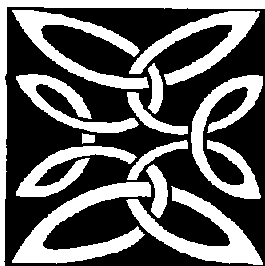
PALABRAS CLAVES: *Adesmia boronioides*, coevolución, emergencia, interacción planta-insecto.

ABSTRACT

Adesmia boronioides, commonly known as “paramela”, is a species within the family Leguminosae that grows in flatlands and mountains of Patagonia (South America), that has been popularly used for different medicinal purposes ranging from rheumatic pains to digestive discomfort. Studies to increase our knowledge on its therapeutic use have yielded promising results as anti-inflammatory and anti-parasitic. The plant also stands out for its antioxidant activity and its qualities for cosmetic and perfume industries. In this contribution we analyze the species plant-insect relationship, considering different aspects: its main phytochemical groups, arthropod taxa, season, plant phenology, associated plant species, altitude, latitude and climate, amongst others. Although it is difficult to draw conclusions with all these aspects taken into account, we have tried to describe what influences the *Adesmia*-arthropod relationship, including many original experiments done by us and other researchers from the region. We discuss a coevolutionary relationship using different examples that include two aphid species (*Aphis adesmiae* and *Uroleucon nahuelhuapense*, both exclusive of *A. boronioides*), and the interaction between *Adesmia bijuga* and a native bumblebee (*Bombus dahlbonii*). We also propose an emergent property resulting from the interaction between *A. boronioides* and its associated arthropods, which influence the proportion of volatile terpenoids generating new combinations/variants of the species' smell. This characteristic is maintained in the different populations and seasons throughout the year, giving the plant its typical and uniquely sweet, balsamic and intense quality.

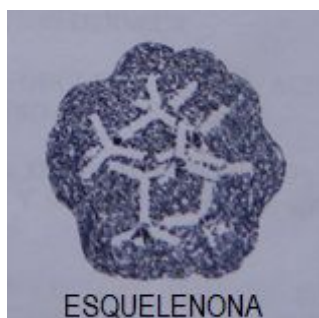
KEY WORDS: *Adesmia boronioides*, Coevolution, emergence, plant-insect interaction.

...”Los celtas han elaborado una concepción de la vida llamada Wyrd: una manera de ser y de evolucionar que trasciende nuestras nociones convencionales de libre albedrío y de determinismo. De este concepto de Wyrd surge una visión del universo representado por un sistema de fibras gigantescas, una especie de monumental tela de araña en tres dimensiones. Cuando se hace vibrar uno de los hilos de la tela, todo el conjunto entra en resonancia, al estar ligados todos sus componentes. Esta imagen trasciende nuestro enfoque de la ecología, que no obstante ya ha ampliado nuestro concepto de causa y efecto a cadenas de influencias más prolongadas y más laterales” ... P. Drouot en El chamán, el físico y el místico.



“Nuestra apreciación de lo importante y de lo accesorio, de lo grande y lo pequeño, asiéntase en un falso juicio, en un verdadero error antropomórfico. En la Naturaleza no hay superior ni inferior ni cosas accesorias y principales.” Santiago Ramón y Cajal

Todo en la naturaleza está conectado, y existe en una interdependencia multivariada, difícil de aprehender cuando lo dividimos en partes. Al estar todo en conexión, cada parte posee algo más, que la trasciende y que es inherente al todo, y como el todo (materia/energía) permanece constante, cada cambio en una pequeña parte se compensa/complementa inevitablemente con un cambio en lo que está directamente en contacto, pero a la vez en el todo, que permanece constante... Paradoja: El todo es eternamente variable y constante a la vez... S. González



INTRODUCCIÓN

La Planta

Adesmia boronioides, también conocida como “paramela”, “yauquén” o “lonckotrevo”, es una especie perteneciente a la familia Leguminosae, dentro de la subfamilia Papilionoideae. La misma crece en pampas y cerros

entre los 0 y los 1500 m s.n.m. en Patagonia, Sudamérica, estando presente en Argentina en seis provincias (Mendoza, Neuquén, Río Negro, Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego) y en Chile en dos regiones (XI y XII) (Instituto Darwinion, 2018) (Figura 1).



Figura 1. Población de *A. boronioides*.
Figure 1. *A. boronioides* population.

A. boronioides suele adoptar forma de arbusto midiendo entre 0,40 y 2 metros de alto. Sus ramas son generalmente rojizas, cubiertas por abundantes glándulas sésiles. Presenta hojas compuestas, con tamaños entre 3-9 cm,

y foliolos entre 2-8 mm, carnosos y obtusos, también con glándulas. Sus flores amarillas, de no más de 10 mm de longitud, están dispuestas en racimos, y su fruto es un lomento compuesto por 3-

5 artejos, glanduloso y pubescente (Ulibarri, 2000) (Figura 2).



Figura 2. Flor y fruto de *A. boronioides*.
Figure 2. Flower and fruit of *A. boronioides*.

Es una especie que ha sido utilizada popularmente con fines medicinales, para dolores reumáticos, caída del cabello, para las vías respiratorias, como agente digestivo, para aliviar malestares menstruales y como afrodisíaco (González, 2002). Asimismo, es citada como febrífuga y contra las quemaduras (Barboza *et al.*, 2009). Se han realizado estudios con el fin de profundizar en su potencial uso terapéutico dando resultados promisorios en relación a su capacidad antiinflamatoria (González *et al.*, 2003) y como antiparasitario, inhibiendo el crecimiento de *Trypanosoma cruzi* (González *et al.*, 2008). A su vez, se obtuvieron datos en ensayos que mostraron una alta actividad antioxidante (González *et al.*, 2013; Gastaldi, 2013).

Metabolismo primario y secundario

Se puede definir como metabolismo al conjunto de reacciones bioquímicas y

físico-químicas llevadas a cabo por los organismos, con el fin de cumplir sus funciones vitales, entre las cuales se encuentran, por ejemplo, crecer y reproducirse. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía forma parte de moléculas comunes a todas las células, constituyendo los llamados *metabolitos primarios* que agrupan, entre otros, a los aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todos los organismos y desempeñando las mismas funciones. Sin embargo las plantas destinan parte del carbono asimilado y de la energía a otro conjunto de reacciones bioquímicas, el metabolismo secundario, que es dependiente y obtiene sus precursores del metabolismo primario. El *metabolismo secundario* se ocupa de la síntesis de una gran variedad de moléculas orgánicas de naturaleza química diversa, que no tienen un rol directo en las funciones vitales de la planta, pero

que sí representan para el vegetal un factor esencial, ya que intervienen en las interacciones de la planta con el ambiente. Si bien pueden ser clasificados con diferentes criterios, pueden ser incluidos en cuatro amplias categorías: Terpenoides, Fenoles, Glicósidos y Alcaloides (Ávalos García & Pérez-Urria, 2009).

Variabilidad en la producción de metabolitos secundarios

Aunque el metabolismo secundario depende de la información genética, es

fuertemente influenciado por determinados factores abióticos o bióticos, como es lógico tratándose de productos naturales que surgen como respuesta al ambiente (Gobbo-Neto & Lopes, 2007). Dentro de los factores abióticos, se pueden mencionar los ambientales como la temperatura, la salinidad, la composición del suelo, la disponibilidad de agua, la radiación, el estrés químico y el estrés mecánico (Petinatti Pavarini *et al.*, 2012; Akula & Ravishankar, 2011) (Figura 3).



Figura 3. Interacciones bióticas y abióticas en las plantas.
Figure 3. Biotic and abiotic interactions in plants.

La latitud, la altitud, los ciclos circadianos (día, noche) y los ciclos estacionales (otoño, invierno, primavera, verano) son variables

abióticas que también intervienen en la producción de estos metabolitos. Al mismo tiempo, todos los factores se relacionan, por ejemplo, la radiación

UV depende de la estación, la capa de ozono, la altitud y la temperatura (Larson, 1988). Estos factores afectan no solamente al metabolismo secundario, sino también al crecimiento y desarrollo del vegetal (metabolismo primario). En cuanto a factores bióticos, se encuentran las interacciones con otras plantas, con patógenos y herbívoros, e incluso la fenología, que

si bien es un proceso interno de la planta está íntimamente relacionado con los ciclos estacionales (Petinatti Pavarini *et al.*, 2012). En síntesis, la regulación del metabolismo secundario involucra la interacción (sinergia o antagonismo) de procesos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos y evolutivos (Hartman, 1996) (Figura 4).

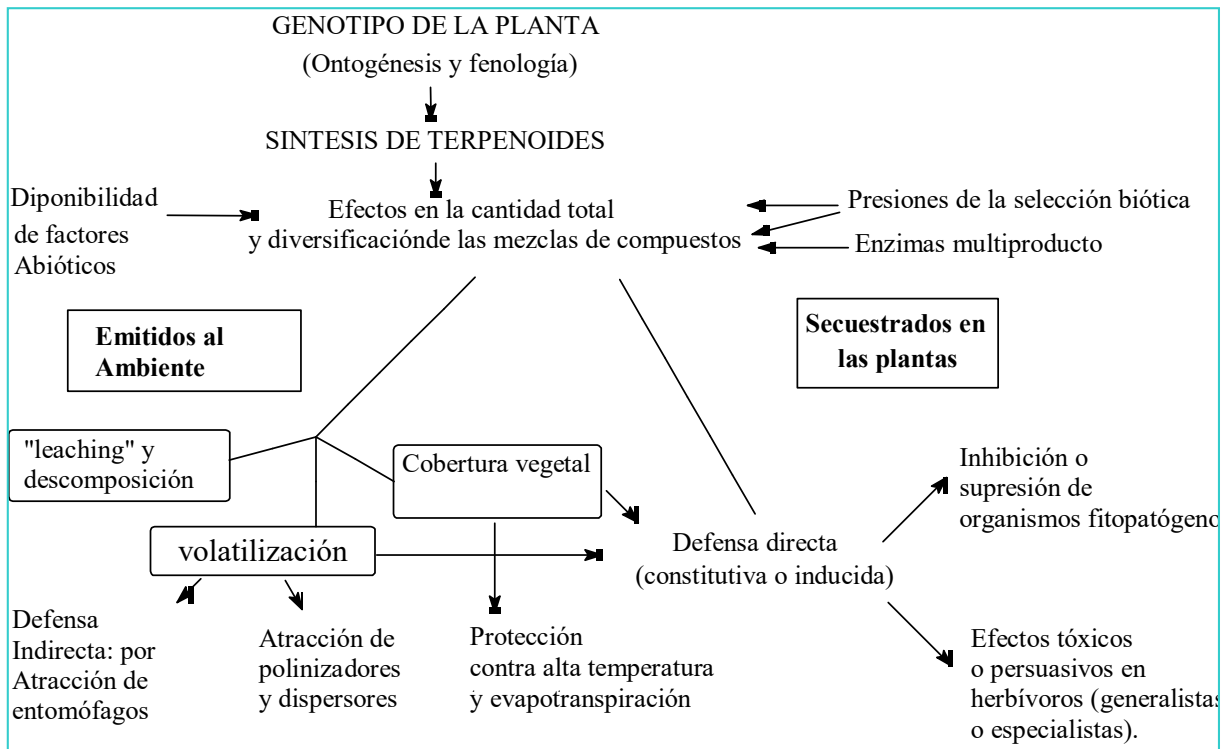


Figura 4. Algunos factores que afectan la síntesis de los terpenoides en las plantas superiores (adaptado de Lagenheim, 1994).

Figure 4. Some factors in higher plants terpenoids synthesis (Adapted from Lagenheim 1994).

Los terpenos sintetizados por la planta se hallan en mezclas, constitutivas o inducidas, y pueden ser emitidos al ambiente por volatilización con el fin de atraer entomófagos o polinizadores, o bien por secreción formando una

cubierta en ramas tiernas y hojas, para proteger de las altas temperaturas y de la evapotranspiración. Los terpenos secuestrados en las plantas pueden actuar en la defensa directa contra organismos fitopatógenos o bien como

sustancias tóxicas o persuasivas para herbívoros (Figura 4). En situaciones de biosíntesis como respuesta inducida, en general, es muy notable el aumento de aquellos componentes que tienen efectos más deletéreos sobre los hongos e insectos (Raffa, 1991). Los constituyentes individuales de las mezclas de terpenos pueden tener múltiples efectos, teniendo entonces un impacto ecológico más amplio. Es el caso del α -pineno y limoneno que intervienen en la defensa directa de la planta contra herbívoros y patógenos, son aleloquímicos y favorecen la polinización. (Lagenheim, 1994). En muchos casos, la generación de estos compuestos promueve modificaciones en los insectos fitófagos, que mediados por la selección natural, generan mecanismos para seguir alimentándose de esas plantas. Estos mecanismos producen un verdadero “contrapunto biológico” entre la generación de compuestos por la planta y los mecanismos de detoxificación de los insectos, evidenciando un mecanismo coevolutivo.

Por su parte los flavonoides cumplen numerosos roles en las plantas tales como defensa ante la radiación UV-B y la infección por patógenos, moléculas señales en la nodulación, en la fertilidad del polen, etc. (Falcone *et al.*, 2012).

Los insectos

Los insectos (Insecta) son una clase de animales invertebrados del filo de los artrópodos, caracterizados por presentar un par de antenas, tres pares de patas y dos pares de alas (que, no obstante, pueden reducirse o faltar), entre otras características. Los insectos son el grupo de animales más diverso de la tierra, con aproximadamente un millón de especies descritas; más que todos los demás grupos de animales juntos y con estimaciones de hasta 30 millones de especies no descritas (algunos autores mencionan una riqueza de entre 6 y 10 millones), con lo que, potencialmente, representarían un porcentaje muy alto de las formas de vida del planeta. Los factores bióticos y abióticos que intervienen en la vida de los insectos se mencionan en la Figura 5.

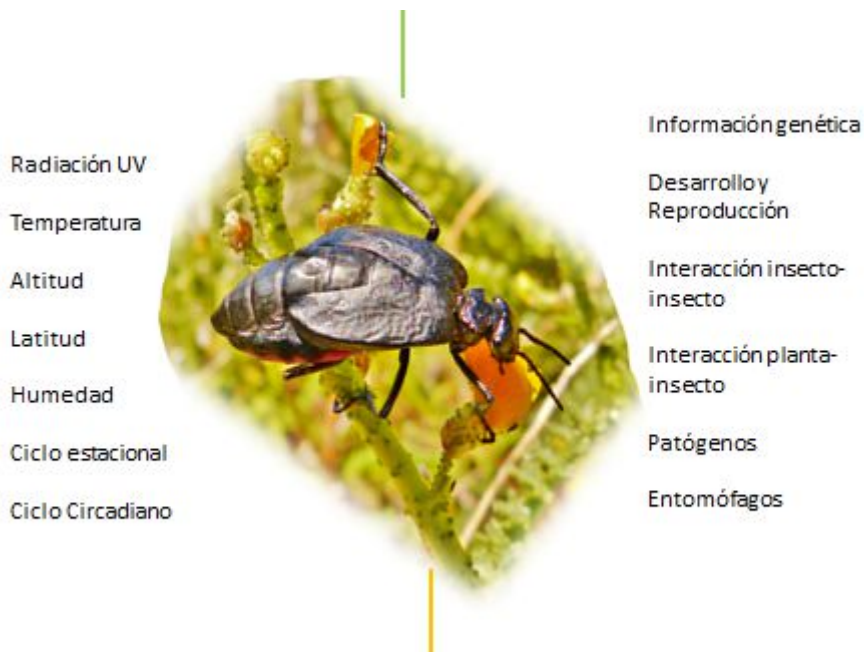


Figura 5. Factores bióticos y abióticos que afectan al insecto. (González S.).

Figure 5. Insects interactions: biotics and abiotics factors (González S.).

Coevolución

Se define como un cambio evolutivo en una característica de los individuos de una población, en respuesta a las cualidades de individuos de una segunda población, seguida de la respuesta evolutiva de la segunda población al cambio de la primera (Janzen, 1980). La Teoría de la Coevolución Bioquímica (Ehrlich y Raven, 1964) establece que la síntesis de compuestos secundarios como toxinas vegetales están específicamente relacionadas con patrones de utilización de plantas hospedadoras por insectos fitófagos. Las angiospermas, mediante mutaciones y recombinaciones ocasionales, producen una serie de compuestos químicos (alcaloides,

terpenoides, flavonoides, etc.) que no están relacionados directamente con el metabolismo básico. Algunos de estos compuestos reducen o destruyen la palatabilidad de la planta en la que se producen. Así, la planta que genera estos compuestos se protege y entra en una nueva zona adaptativa. Los insectos fitófagos pueden evolucionar, en respuestas a la producción de estos compuestos por parte de las plantas, con respuestas fisiológicas como la detoxificación. La selección natural, actuando en las poblaciones de insectos expuestas a estas interacciones, podría llevar a una zona recombinante o mutante y, sucesivamente, a una nueva zona adaptativa. Los insectos que pudieran de alguna manera adaptativa,

neutralizar o minimizar los efectos de los compuestos generados por las plantas, encontrarían un espacio para diversificarse, en ausencia de competencia con otros insectos. La

especialización para generar compuestos repelentes en las plantas y su respectiva detoxificación en insectos, llevaría a una coevolución entre estas especies (Tabla I).

Tabla I. Ejemplo de coevolución química entre plantas y animales.

Table I. Chemical coevolution between animals and plants.

Secuencia de eventos	Respuesta en planta	Respuesta en animal
1	Síntesis y acumulación de Toxina I	Todas las especies las evitan
2	Síntesis continua	Pocas especies se adaptan. Mayoría de las especies las evitan
3	Supervivencia con depredación limitada	La toxina 1 se convierte en un atrayente alimenticio para las especies adaptadas
4		Más especies se adaptan causando presión en la herbivoría
5	Síntesis y acumulación de la toxina II	todas las especies las evitan
6*	Síntesis continuada de Toxinas I y II	Adaptación de pocas especies, la mayoría de las especies las evitan

* Eventos adicionales pueden incluir la desaparición Toxina I de la planta y la síntesis de más toxinas efectivas III y IV, etc. (Material del curso Bioquímica Ecológica FCNyCS-UNPSB, 2019).

Propiedades Emergentes

El concepto de *emergencia* fue creado para designar propiedades de los grupos que no pueden ser explicadas completamente por sus componentes individuales (Mayr, 1982).

Desde un enfoque mecanicista básico, para que surja la emergencia de propiedades que superen aquéllas

propias de los componentes individuales, se requiere que éstos compartan propiedades comunes y con las suficientes materia y energía concentradas en el espacio y el tiempo, para desplegar un efecto medible y de larga duración.

Esto ocurre por una amplificación de fenómenos restringidos en el espacio o

tiempo, pasando en un tiempo y espacio dados, desde el caos al orden (Levin, 2000).

Varias hipótesis de las influencias en las interacciones planta-herbívoro y herbívoro-predador consideran los efectos interactivos de la **calidad de la**

planta, la amplitud de la dieta del herbívoro y sus enemigos naturales (**predadores**). Pero estas hipótesis fallan a la hora de considerar la influencia simultánea de los 3 factores. (Mooney *et al.*, 2012).

Tabla II. Descripción de las 3 hipótesis tradicionales para las interacciones planta-herbívoro y herbívoro-predador y sus relaciones con la hipótesis de interacciones tri-tróficas (ITT). (adaptado de Mooney *et al.*, 2012).

Table II. Descriptions of three long-standing hypotheses for plant-herbivore and herbivore-predator interactions and their relation to the tri-trophic interactions hypothesis (adapted from Mooney *et al.*, 2012).

Hipótesis original			Predicciones bajo ITT
Nombre	Factor considerado	Predicciones	
Eficiencia fisiológica	Amplitud de la dieta, calidad de la planta	Los especialistas están mejor adaptados que los generalistas al compartir plantas como alimentos y la variación en calidad de planta-huésped tendría mayores efectos sobre los generalistas que sobre los especialistas.	Los beneficios de la especialización para el desempeño es mayor en presencia de enemigos naturales (que en ausencia).
Espacio libre de enemigos	Amplitud de la dieta, enemigos naturales	Los especialistas son mejores que los generalistas al compartir plantas para la evitación de predadores.	Los beneficios de la evitación de predadores de los especialistas son mayores en plantas de baja calidad.
Crecimiento lento/alta mortalidad	Calidad de plantas, enemigos naturales	Las plantas de baja calidad aumentan el efecto de enemigos naturales.	Las plantas de baja calidad aumentan el efecto de enemigos naturales en mayor medida para los generalistas (que para especialistas)

Para comprender la complejidad de los sistemas ecológicos son necesarios enfoques más realistas. Las propiedades

emergentes de sistemas reales pueden usarse como base para nuevas miradas, no reduccionistas ni holísticas. Se

identificaron tres sistemas que exhiben propiedades emergentes (burbuja, onda y cristal). No existe un ensamble jerárquico de los componentes individuales, con la amplificación y conexión como los dos principios que gobiernan su desarrollo, mantenimiento y relaciones mutuas. Encontramos ejemplos dentro de los campos de las ciencias biológicas y ecológicas, incluyendo desde organismos individuales hasta paisajes (Ponge, 2004).

INVESTIGACIÓN

Origen de las *Leguminosae* y del género *Adesmia*

Las *Leguminosae* se diversificaron en el Terciario temprano para convertirse en un elemento ubicuo en la biota terrestre, en tiempos en que se diversificaron otros grupos terrestres prevalentes, como las familias dominantes de angiospermas, helechos, mamíferos, peces teleósteos, aves e insectos (Lavin *et al.*, 2005) (Figura 6).

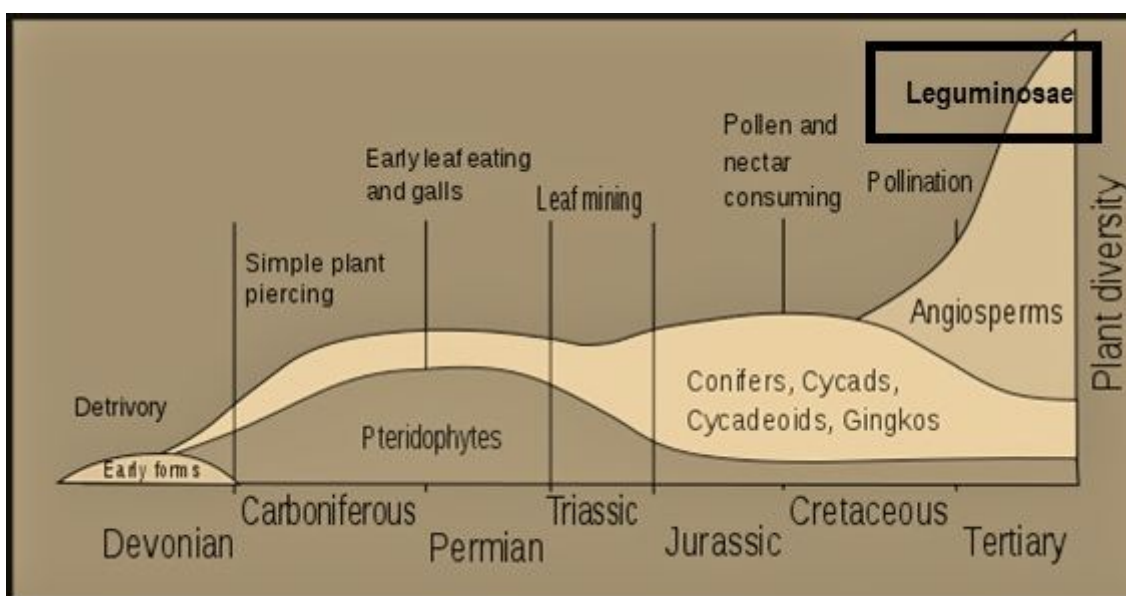


Figura 6. Cronología de la evolución de las plantas y los inicios de los diferentes tipos de herbivoría de insectos. Surgimiento de las *Leguminosae* en el Terciario temprano. (material del curso Bioquímica ecológica 2018 FCNyCS UNPSJB, modificado por González S.).

Figure 6. Chronological evolution of plants and emergence of insects herbivory. *Leguminosae* emergence during tertiary age.

Ya a fines de la Era Cenozoica, hace menos de 6 Ma, durante el Plioceno y Pleistoceno, los Andes llegaron a su máxima altura y se dieron las condiciones más secas y frías en el continente sudamericano, produciendo

importantes glaciaciones. Estos cambios climáticos y geográficos produjeron nuevos ambientes y un aumento en el número de especies de géneros andino-patagónicos como *Adesmia* (e.g.,

paramela, mamuel choique) Raffaele *et al.*, 2004).

Características histológicas de *A. boronioides*

De acuerdo a los estudios efectuados se pueden definir como originales, los siguientes caracteres histológicos de

diagnóstico de los órganos vegetativos de *A. boronioides*: **Hoja, vista superficial:** Tricomas tectores en ambas epidermis, con extremo distal encorvado; estomas ciclocíticos en caras adaxial y abaxial.; poros de secreción “crateriformes” (Figura 7).

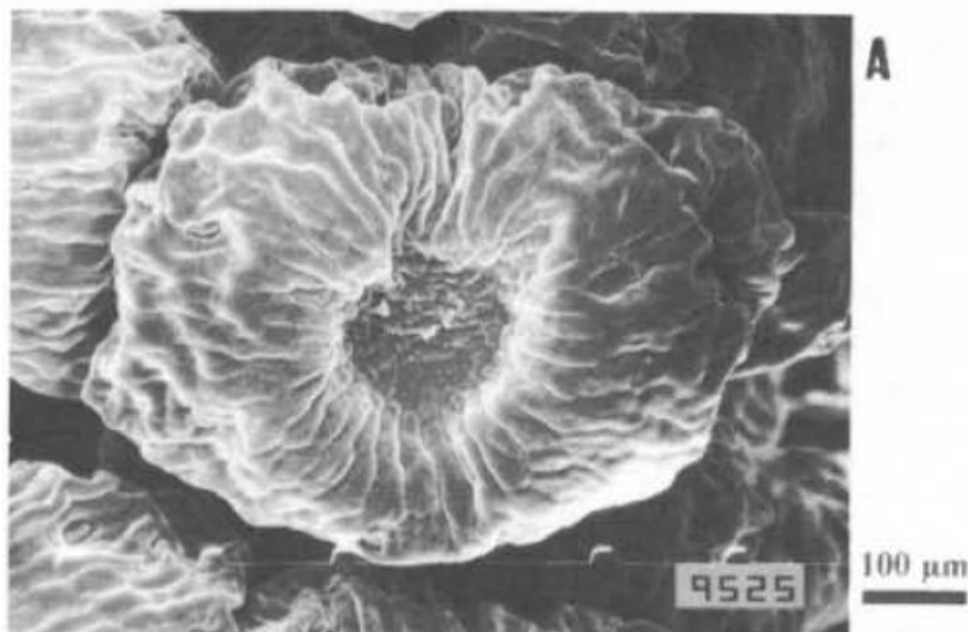


Figura 7. Fotografía MEB de la estructura secretora (Nájera *et al.*, 2000).

Figure 7. MEB image of secretory structure (Nájera *et al.*, 2000).

Hoja, corte transverso: cutícula gruesa; epidermis uniestratificadas interrumpidas por estomas y tricomas; mesófilo bilateral; sistema vascular de haces colaterales; cristales simples de oxalato de calcio. **Tallo, corte transverso:** epidermis con tricomas tectores y poros secretores “crateriformes”; haces colaterales con casquete de fibras pericíclicas; estructuras secretoras con contenido

pardo rojizo en corteza y médula. **Tallo, corte longitudinal:** tubos de secreción en corteza y médula; cristales simples de oxalato de calcio en parénquima medular.

De acuerdo a algunos autores, la localización superficial de toxinas afectan principalmente a los insectos, en este caso particular la presencia de resinas, que pueden producir

inmovilización de algunos de ellos (Figura 8).

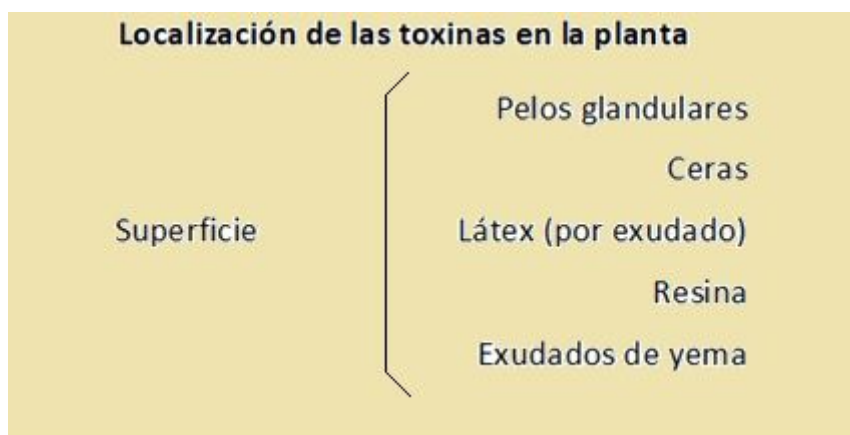


Figura 8. Localización de las toxinas superficiales en plantas (adaptado del material del curso Bioquímica Ecológica).

Figure 8. Superficial toxins locations in plants.

Estudios fitoquímicos

Terpenoides

Además de ser medicinal, *A. boronioides* es una planta aromática, por lo cual han sido estudiados exhaustivamente sus aceites esenciales, habiéndose identificado más del 90% de sus constituyentes volátiles (González *et al.*, 2002; 2004; 2016), destacándose entre ellos un nuevo esqueleto sesquiterpeno, que fue nombrado como Esquelenona (Figura 9 y Tabla III). Se

han analizado, además, la variabilidad de estos componentes volátiles a lo largo de un gradiente latitudinal que incluyó a las provincias de Neuquén, Río Negro, Chubut y Santa Cruz, identificándose la presencia de quimiotipos (González *et al.*, 2016).

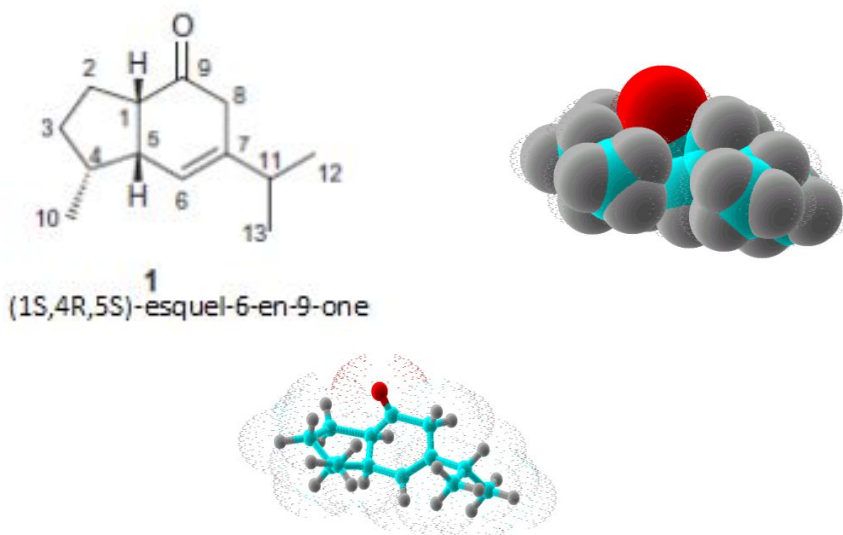


Figura 9. Un bis-norsesquiterpeno, componente mayoritario en el aceite esencial de *A. boronioides* en 15 poblaciones estudiadas, fórmula estructural y modelos moleculares. (González S.).

Figure 9. bisnorsesquiterpene from major component of *A. boronioides* essential oil. Structure and molecular models.

Tabla III. Composición promedio de los aceites esenciales de *A. boronioides* (González *et al.*, 2004).

Table III. Essential oil composition of *A. boronioides* (González *et al.*, 2004).

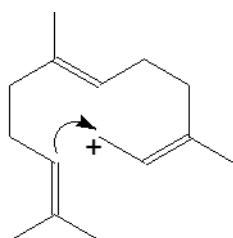
Table I. Percentage composition of the oil components of *Adesmia boronioides*

Peak number ^a	Compound	RI ₁ ^b	RI ₂ ^c	%	Peak number ^a	Compound	RI ₁ ^b	RI ₂ ^c	%
1	α -pinene	112	209	3.0	31	<i>trans</i> -carveol	515	341	0.5
2	β -pinene	148	225	0.4	32	aristolone	520	640	0.2
3	limonene	204	250	0.3	33	<i>p</i> -cymen-8-ol	522	323	0.4
4	1,8-cineole	209	248	0.1	34	α -agarofuran	536	507	2.8
5	(E)-2-hexenal	212	147	0.3	35	<i>cis</i> -muuroiol-5-en-4 β -ol	545	510	0.6
6	<i>o</i> -cymene	233	245	0.4	36	α -calacorene	548	506	0.5
7	<i>o</i> -gualacol	314	240	0.5	37	cubebol	562	495	2.8
8	<i>cis</i> -linalool oxide [*]	325	-	0.1	38	esquel-6-en-9-one	563	482	19.1
9	α -cubebene	328	419	1.0	39	α -muuroiol	566	557	0.6
10	<i>trans</i> -linalool oxide [*]	338	268	0.1	40	β -calacorene	570	513	0.1
11	α -copaene	344	429	0.8	41	furopelargone A	576	501	0.5
12	α -campholenal	345	295	0.4	42	<i>epi</i> - α -muuroiol	580	554	0.4
13	β -bourbonene	357	431	0.1	43	ledol	601	537	0.4
14	β -cubebene	366	434	0.5	44	gleenol	608	531	0.6
15	linalool	376	285	0.4	45	α -copaen-11-ol	617	509	8.5
16	guaia-6,9-diene	400	460	0.6	46	cubenol	618	561	1.9
17	terpinen-4-ol	402	321	0.2	47	1- <i>epi</i> -cubenol	622	552	3.5
18	aromadendrene	408	465	0.4	48	gualol acetate	628	558	0.6
19	alio-aromadendrene	418	463	0.3	49	furopelargone B	634	522	1.9
20	<i>trans</i> -sabinol	425	304	0.1	50	10- <i>epi</i> - γ -eudesmol	640	553	4.6
21	<i>epi</i> -zonarene	427	490	0.7	51	β -copaen-4 α -ol	660	516	0.3
22	<i>trans</i> -pinocarveol	429	306	0.1	52	α -eudesmol	662	561	0.1
23	<i>cis</i> -verbenol	430	308	0.1	53	esquel-7-en-9-one	671	529	12.5
24	α -terpineol	449	330	0.2	54	occidol	681	-	0.5
25	γ -muuroiene	451	485	1.0	55	<i>epi</i> - α -cadinol	687	560	2.0
26	β -dihydroagarofuran	454	494	1.3	56	cadalene	690	566	0.4
27	α -muurolene	456	487	0.7	57	4 α -hydroxy-dihydroagarofurane	700	558	3.6
28	δ -cadinene	473	503	5.8	58	esquel-7-en-6-ol-9-one	800	604	1.0
29	cadina-1,4-diene	483	506	0.4	58	esquelphenol	860	533	0.5
30	<i>cis</i> -calamenene	509	498	1.6	59				

^acompounds are listed according to polar column order; ^bretention index in Carbowax 20M; ^cretention index in SE30; ^{*}furanoid form

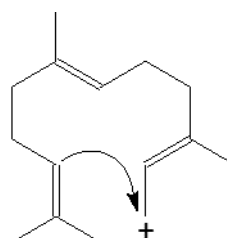
Entre los componentes de los aceites esenciales se encuentran mono y sesquiterpenos, éstos últimos mayormente representados por esqueletos sesquiterpénicos de los siguientes orígenes (Figura 10): **Derivados del esqueleto cadinano**, principalmente δ -cadineno y calameneno. Los que poseen esqueletos cubebano y copaano se consideran subclases derivadas del cadinano. Se

encuentran dentro de estas subclases, estructuras como el α -copaenol y cubebenos. **Derivados del esqueleto germacrano**, pertenecen a este grupo los esqueletos eudesmano y guaiano. Encontramos como representantes mayoritarios en el aceite esencial, 10-epi- γ -eudesmol y agarofuranos con esqueleto eudesmano; y esquelenona, isoesquelenona y furopelargonos, con esqueleto guaiano.



2Z, 6E-FPP

Cadinano: esqueletos cadinano, copaano, cubebano, muurolano.



2E, 6E-FPP

Germacrano: esqueletos eudesmano, eremofilano, guaiano.

Figura 10. Esqueletos cadinano y germacrano, y sus derivados, en el aceite esencial de *A. boronioides*. (González, 2002.).

Figure 10. Cadinane and germacrane skeletons and their derivatives in *A. boronioides* essential oils.

Un aspecto muy interesante de notar es la presencia de mayor porcentaje de monoterpenos y hemiterpenos en los

sitios más australes, en particular de un precursor de glicósidos cianogénicos el 2-metilbutanonitrilo (Figuras 11 y 12).

% según clase terpenos 2014

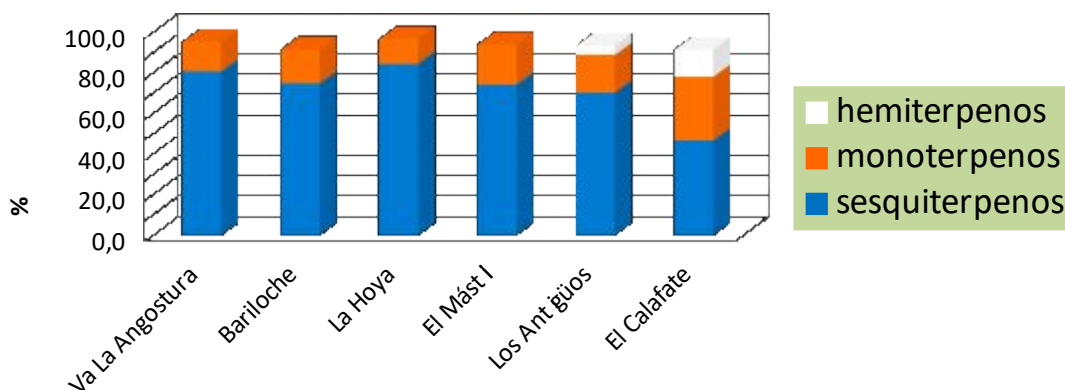


Figura 11. Porcentaje según clase de terpenos en los aceites esenciales de *A. boronioides* en 6 sitios de la Patagonia (González S.).

Figure 11. Terpenes types percentages in *A. boronioides* essential oils. Six locations in Patagonia (S. González).

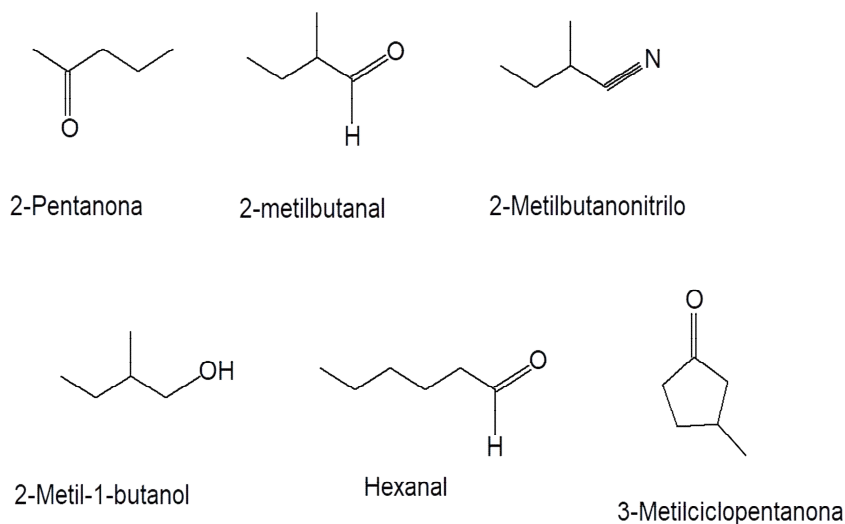


Figura 12. Hemiterpenos presentes en el aceite esencial de *A. boronioides*; el 2-metilbutanonitrilo puede ser precursor de la lotaustralina, glicósido cianogénico (González S.).

Figure 12. Hemiterpenes in *A. boronioides* essential oils (González S.).

Los nitrilos (2-metilpropanonitrilo y 2-metilbutanonitrilo) son probables intermediarios en la biosíntesis de los glucósidos cianogénicos: Linamarina y

Lotaustralina, a partir de los aminoácidos Valina e Isoleucina, respectivamente (Figura 13).

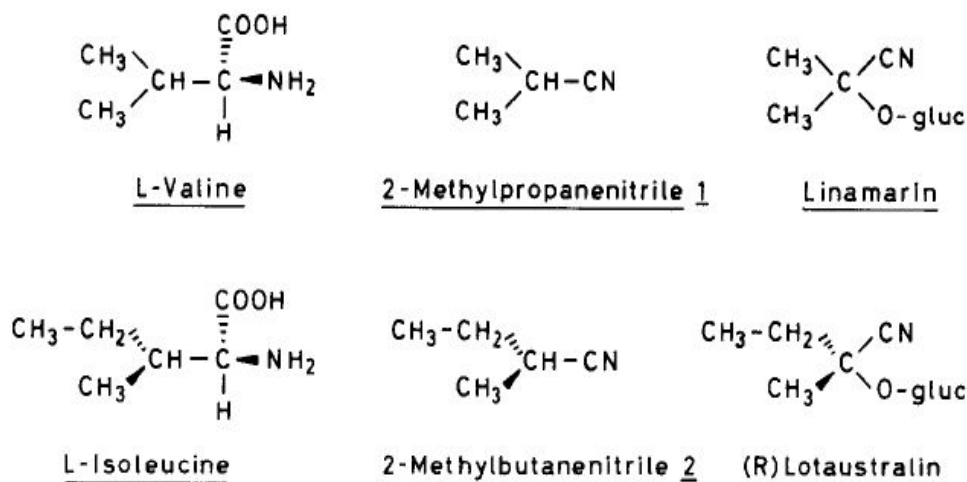


Figure 13. Biosíntesis de glicósidos cianogénicos a partir de aminoácidos (Davis and Nahrstedt, 1987).
Figure 13. Cyanogenic glycosides biosynthesis from aminoacids (Davis and Nahrstedt, 1987).

Fenoles y flavonoides

Se ha estudiado la presencia de fenoles y flavonoides en doce sitios representativos de su distribución patagónica, en algunos casos en diferentes épocas del año. Se midieron la actividad antioxidante, el contenido total de fenoles y el contenido total de flavonoides (Silva Sofrás, 2016; Gastaldi *et al.*, 2018). Entre los flavonoides y sus glicósidos se detectaron rutina, quercetina, quercetina 3-O-glicósido, robinina, quercitrina y luteolina 3'-O-glucurónido. Los mayores valores de actividad antioxidante y contenido total de fenoles y flavonoides correspondieron a sitios muestreados durante el otoño.

Glicósidos cianogénicos

En cuanto al estudio de los glicósidos cianogénicos, en distintas poblaciones de su distribución patagónica se detectó su presencia exclusivamente en las ubicaciones más australes. Sin embargo, no es una especie cianogénica estrictamente hablando, por ausencia de una enzima. El HCN liberado por la especie alcanzó valores de 0,47 µg de HCN/g de planta (Silva Sofrás, 2016).

Estudios de los artrópodos asociados a *A. boronioides*

Martin (2001) realizó un estudio detallado sobre la entomofauna asociada a *A. boronioides* en poblaciones del Cerro La Hoya, Esquel (Chubut), encontrando una riqueza y diversidad de especies muy notable, relacionada con

variables como la edad y el tamaño de las plantas, su altitud y estación del año (Tabla IV).

Tabla IV. Entomofauna asociada a *A. boronioides* en el Cerro La Hoya (Martin, 2001).
Table IV. Entomofauna of *A. boronioides* in La Hoya mountain (Martin, 2001).

Riqueza específica, densidad y abundancia relativa por orden.

Orden	Abundancia Relativa %	Número De Individuos	Número De Especies
Hymenoptera	2,8	83	28
Diptera	1,99	59	24
Hemiptera	35,82	1061	4
Coleoptera	2,3	68	11
Thysanoptera	45,17	1338	1
Collembola	2,39	71	1
Lepidoptera	0,03	1	1
Araneae	1,72	51	8
Acari	2,39	71	1
Huevos	0,2	6	1
Larvas	5,03	149	9
Pupas	0,03	1	1
Indeterminados	0,1	3	3
	99,97	2962	93

Los artrópodos encontrados se dividieron en 2 gremios, de acuerdo al recurso principal que utilizan como alimento: **Fitófagos**, que corresponde a todos los artrópodos que utilizan en mayor proporción alguna parte de la planta como alimento en su ciclo de vida (e.g., *Aphidae* como succionador de savia, *Curculionidae* en estado larval como consumidor de semillas, *Buprestidae* como consumidor de la parte herbácea, *Thysanoptera* como consumidor de partes de las flores, *Vespidae* como consumidor de polen o néctar); y **Depredadores**, que

corresponde a los artrópodos que se alimentan mayormente de otros artrópodos (e.g., *Coccinelidae*, que se alimenta de pulgones; algunos *Hymenoptera* como **parasitoides** o hiperparasitoides; *Araneida*, que se alimentan de insectos). Las principales conclusiones de este trabajo fueron que: **La riqueza específica total de artrópodos asociados a *A. boronioides* no presentó diferencias significativas a lo largo del gradiente altitudinal.** Sin embargo sí se registraron cambios en la composición faunística existiendo un reemplazo de especies en los

distintos niveles. La densidad de individuos por planta aumentó con la altura del sitio de estudio, cuando los registros fueron realizados sobre las plantas de mayores tallas. Este patrón no se cumplió cuando todas las tallas de *A. boronioides* se consideraron en su conjunto. **La densidad y la riqueza taxonómica no permanecieron constantes a lo largo del período de estudio sino que disminuyeron hacia los meses invernales.** La densidad y diversidad de los organismos asociados a *A. boronioides* presentaron variaciones en función del tamaño de planta, registrándose menores valores de riqueza y densidad en las tallas menores. **La mayor variación en la composición y densidad de especies asociadas a *A. boronioides* estuvo explicada por el factor estacional, las tallas de los arbustos estudiados y la altura de los sitios muestreados.** Sin embargo, existió una gran cantidad de registros de especies únicas y de baja frecuencia, lo que podría explicarse por aportes de especies satélites provenientes del resto de las plantas que acompañan a *Adesmia* en la comunidad de herbáceas de La Hoya.

Forcone et al. (2009) siguieron la fenología de floración de las especies registradas en el área de influencia de los colmenares del valle de Los

Antiguos (Santa Cruz). Relevaron las especies entomófilas que, en estudios previos realizados por los autores, fueron registradas como frecuentadas por *Apis mellifera*. Cabe destacar que entre las plantas clasificadas como “no visitadas” se registró *A. boronioides*, especie nativa melitófila que según este estudio impacta visualmente en el paisaje por su abundancia.

Por otra parte, Delfino (2009) documenta una nueva especie de áfido asociada con *A. boronioides* (*Aphis adesmiae* Delfino sp. n.), cuyos caracteres morfológicos correspondientes a una hembra vivípara áptera y describe aspectos de su biología. Nieto Nafria et al. (2016) estudiaron 34 muestras de pulgones del género *Aphis* recogidas sobre especies de *Adesmia* en Argentina y Chile e identificaron siete especies: *A. craccivora*, cosmopolita y polífaga, *A. mendocina* y *A. adesmiae*, ya citadas en Argentina sobre *Urtica mollis* y *Adesmia boronioides*, respectivamente, y cuatro especies nuevas; describen, además, las hembras vivíparas aladas de *A. adesmiae* (Figura 14) y proporcionan una clave de identificación para las hembras vivíparas ápteras del género *Aphis* que viven sobre especies de *Adesmia* (Tabla V). Las colonias se establecen en las

ramas finas de la hospedadora y son muy apretadas (Delfino *et al.*, 2009).

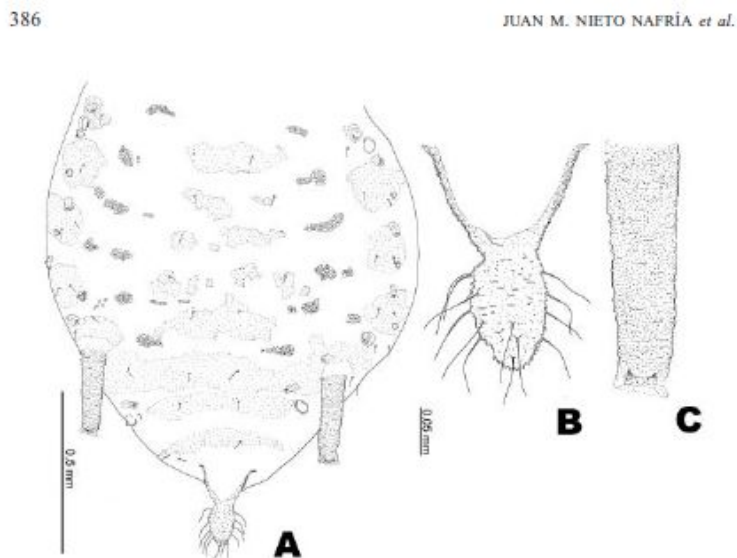


Figura 14. Hembras vivíparas aladas de *Aphis adesmiae* Delfino, A: dorso del abdomen; B: cola; C: cornículo. (Nieto Nafria *et al.* 2016).

Figure 14. Viviparous female of *Aphis adesmiae* Delfino. A: dorsum of the abdomen; B: cauda; C: antenna. (Nieto Nafria *et al.* 2016).

Tabla V. Sitios donde se encontraron los áfidos en *A. boronioides*. (Nieto Nafria *et al.* 2016).

Table V. Locations where *Aphis* were found on *A. boronioides*. (Nieto Nafria *et al.* 2016).

Grupo	Muestra	Territ.	Localidad	Coordenadas y altitud	Fecha	Hospedadora
PAP	ARG-1043 [se-cuen.]	CHU	Río Mayo	45°41'S, 70°15'O; 550 m	13-dic-04	<i>Adesmia</i> sp.
ROS	ARG-475	NEU	Zapala	38°44'S, 70°16'O; 1050 m	24-ene-00	<i>A. boronioides</i>
BRI	ARG-1586	NEU	Paso de Pino Hachado	38°38'S, 70°19'O; 1410 m	12-dic-09	<i>A. boronioides</i>
	ARG-1673	NEU	Puerto Huemul	40°59'S, 71°20'O; 900 m	14-dic-09	<i>A. boronioides</i>

Así, *A. boronioides* es la única hospedadora conocida de este pulgón (*Aphis adesmiae*), tanto en el sur de la Argentina (i.e., Santa Cruz) y a muy baja altitud como en zonas andinas situadas mucho más al norte, en la provincia del Neuquén. La distancia que separa las localidades más extremas de este estudio, entre Güer Aike y Paso de Pino Hachado, es de unos 1450 km en línea recta.

Más recientemente, Nieto Nafria *et al.* (2019) mencionan a una nueva especie de áfido, *Uroleuocon nahuelhuapense*, que se alimenta de los tallos de *A. boronioides*, hasta ahora el único hospedador conocido para la especie (Figura 15).



FIGURE 1. *Uroleucon nahuelhuapense* Nieto Nafria & von Dohlen, **sp. n.** Apterous viviparous female. A, habitus. B, Antennal segments II and III. C, Antennal segment VI and very end of antennal segment V. D, Tarsus and very end of tibia of hind leg. E, Siphunculus. F, Apical part of siphunculus. G, cauda and anal plate. A–C, F and G, holotype; D and E, a paratype, specimen number 5.

Figura 15. Hembra vivípara de *Uroleucon nahuelhuapense* Nieto Nafria & von Dohlen.

Figure 15. Viviparous female of *Uroleucon nahuelhuapense* Nieto Nafria & von Dohlen.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Rasgos de defensa en *A. boronioides*

Dentro de los rasgos o características de defensa de las plantas (constitutivas e

inducibles) se identificaron en *A. boronioides* la presencia de:

1. **Tricomos** tectores de tipo semimalpighiáceo en tallos y hojas. (Figura 16)

2. **Cristales de oxalato de calcio**, simples, tanto en hoja como en tallo. (Figura 17).
3. **Resinas**, con mayor abundancia durante el invierno (Figura 18).
4. **Mono y Sesquiterpenos**, algunos ampliamente reconocidos como elementos de defensa, por ejemplo el limoneno y el α -pineno. Este último posee múltiples efectos tanto en defensa directa como indirecta (alelopatía, atracción de entomófagos, etc.). Los insectos son sensibles a pequeñas concentraciones de productos químicos volátiles
5. **Glicósidos cianogénicos**, *A. boronioides* presenta glicósidos cianogénicos en sus poblaciones más australes, esto es coherente con la presencia significativa del 2-metilbutanonitrilo, precursor de la lotaustralina, en los compuestos volátiles de *A. boronioides*, para esas localidades (González, 2014). Las poblaciones cianogénicas están asociadas con locaciones de poca altitud y su función podría estar ligada a diferentes factores endógenos o exógenos, como por ejemplo la presencia de insectos que se alimentan de sus semillas, observados en las muestras recolectadas (Delfino, 2009).
6. **Fenoles y flavonoides**, en un estudio cualitativo de detección de fenoles y flavonoides se pudieron caracterizar en total 17 constituyentes, de los cuales 3 son ácidos fenólicos y 14, flavonoides. Flavonoides como quercetina, camferol, apigenina inhiben el transporte de auxina y mejoran su localización en la planta, en caso de estrés de la misma por diferentes factores.

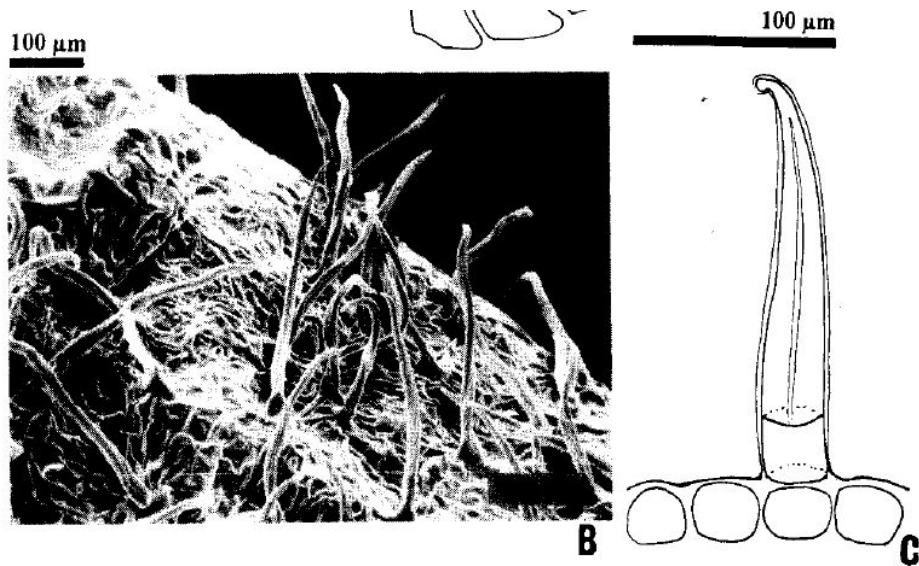


Figura 16. Tricomos tectores de tipo semimalpighiáceo en la epidermis. (Nájera *et al.*, 2000).

Figure 16. Protector trichomes semimalpighiaceae type in the epidermis. (Nájera *et al.*, 2000).

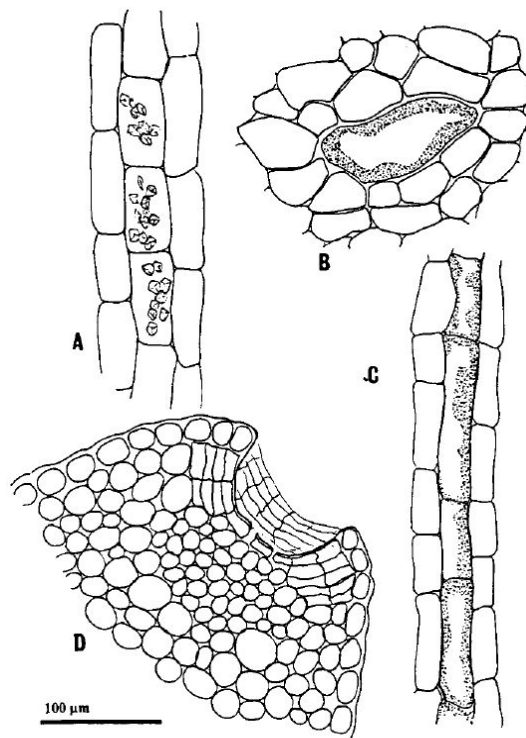


Figura 2. Tallo primario: A: corte longitudinal del parénquima medular con cristales; B y C: tubo de secreción en corte transverso y longitudinal respectivamente; D: poro de secreción en corte longitudinal.

Figura 17. Análisis estructural de tallo. Presencia de cristales de oxalato y estructura de las glándulas secretoras (Nájera *et al.*, 2000).

Figure 17. Stem structure analysis. Oxalate crystals in the cells and the secretory gland structure (Nájera *et al.*, 2000).

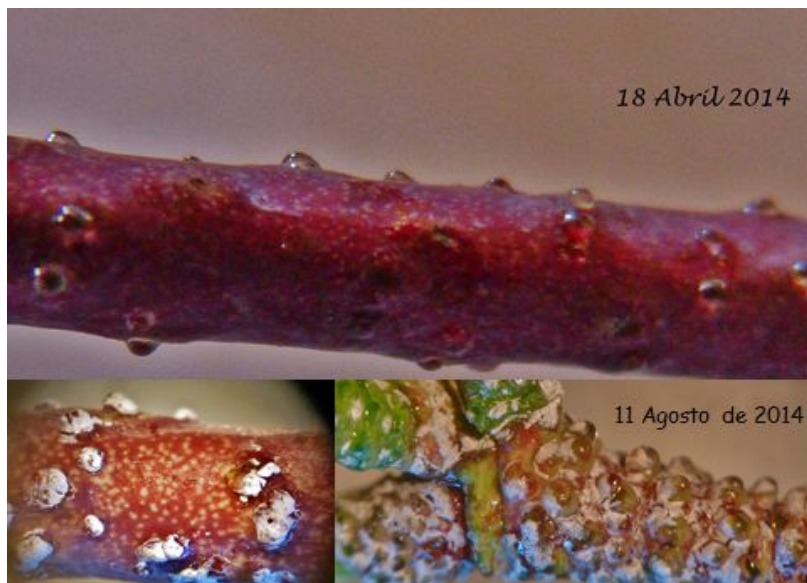


Figura 18. Resinas de *A. boronioides* aumentan en contenido y cambian de aspecto durante el invierno (González S.).

Figure 18. *A. boronioides* resins are higher in winter (González S.).

Correlaciones entre el estudio de los insectos y los terpenoides en *A. boronioides*

El análisis comparativo entre el estudio la entomofauna de *A. boronioides* y los análisis de los aceites esenciales (mono y sesquiterpenos) en el sitio La Hoya, pone en evidencia algunas relaciones interesantes, a saber:

1) Época del año:

De acuerdo a los resultados que se observan en el gráfico de la figura 19, entre los meses de mayo a agosto aumenta la producción de aceites esenciales y resinas. Esta mayor concentración de aceites esenciales se corresponde con los meses de menor

temperatura media, que también son coincidentes con las mayores precipitaciones pluviales y/o nivas. Aunque no es posible definir cuál de los dos factores climáticos podría tener mayor influencia en ese comportamiento fisiológico, podría pensarse que la mayor secreción se deba en realidad a un mecanismo de defensa contra el frío, dado que los aceites tienen un punto de congelamiento muy por debajo del agua. Por otra parte es la época que se observa menor presencia de insectos.

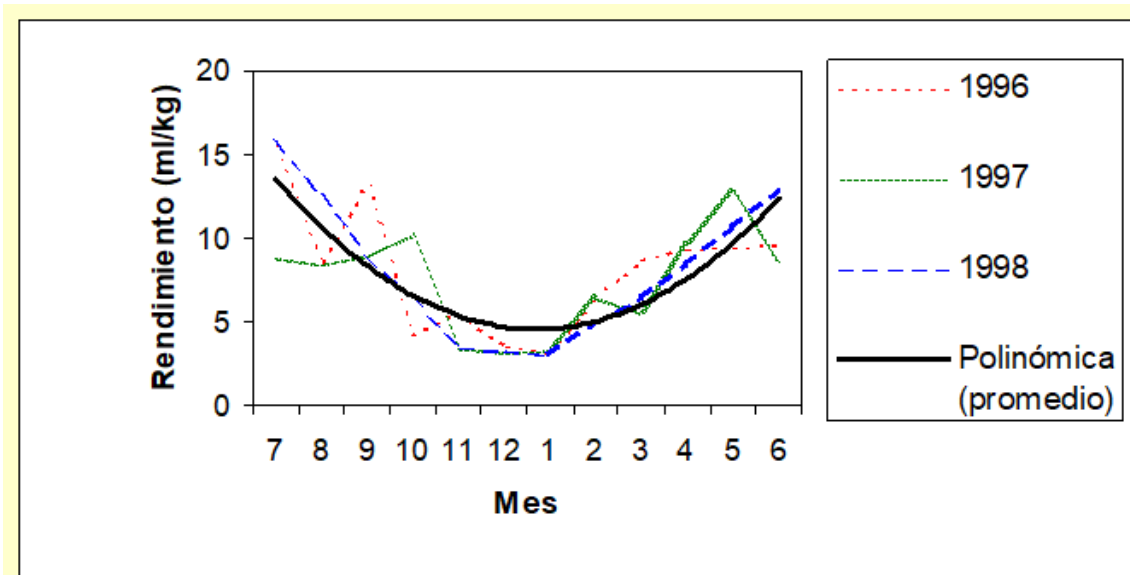


Figura 19. Variación mensual del contenido de volátiles en el trienio 1996-1998. (González S., 2002).
Figure 19. Monthly variation of essential oils between 1996-1998. (González S., 2002).

En mayo se observa una disminución de los artrópodos en general, y una proporción menor de depredadores (Hymenoptera) y una mayor proporción de Hemiptera (*Aphis* pertenece a este

grupo). La curva observada tanto para densidad como para riqueza, muestra claramente la **disminución progresiva de las especies a medida que se acerca el invierno**. Figuras 20 y 21.

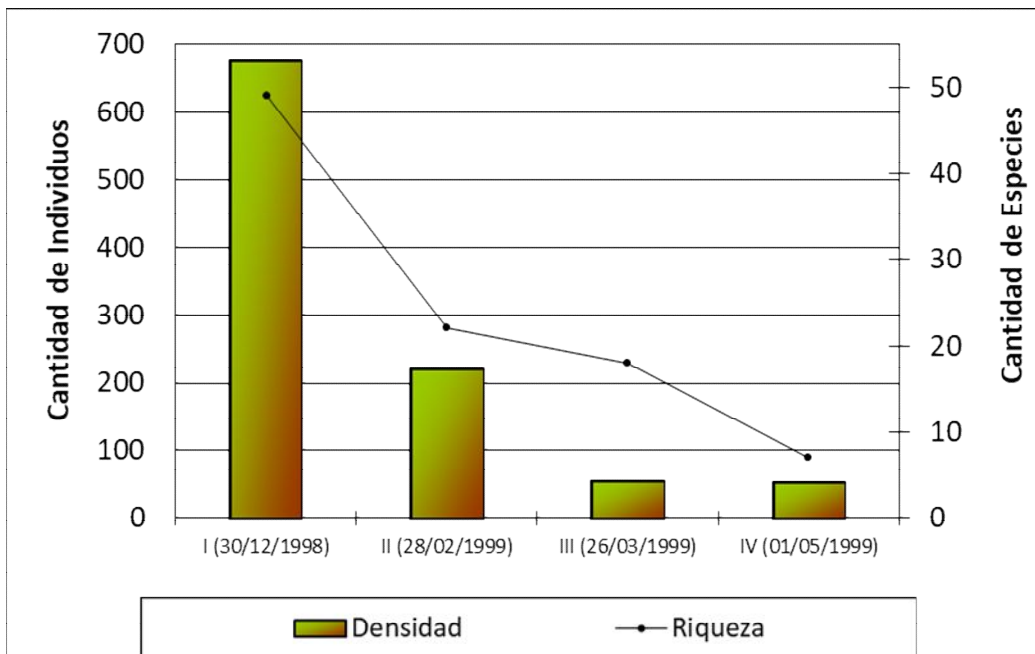


Figura 20: Valores acumulados de riqueza taxonómica y densidad de artrópodos asociados a *A. boronioides* de Diciembre a Mayo (n=27). (Martin, 2001).
Figure 20: Cumulative values of taxonomic richness and arthropod density in *A. boronioides* from December to May (n=27). (Martin, 2001).

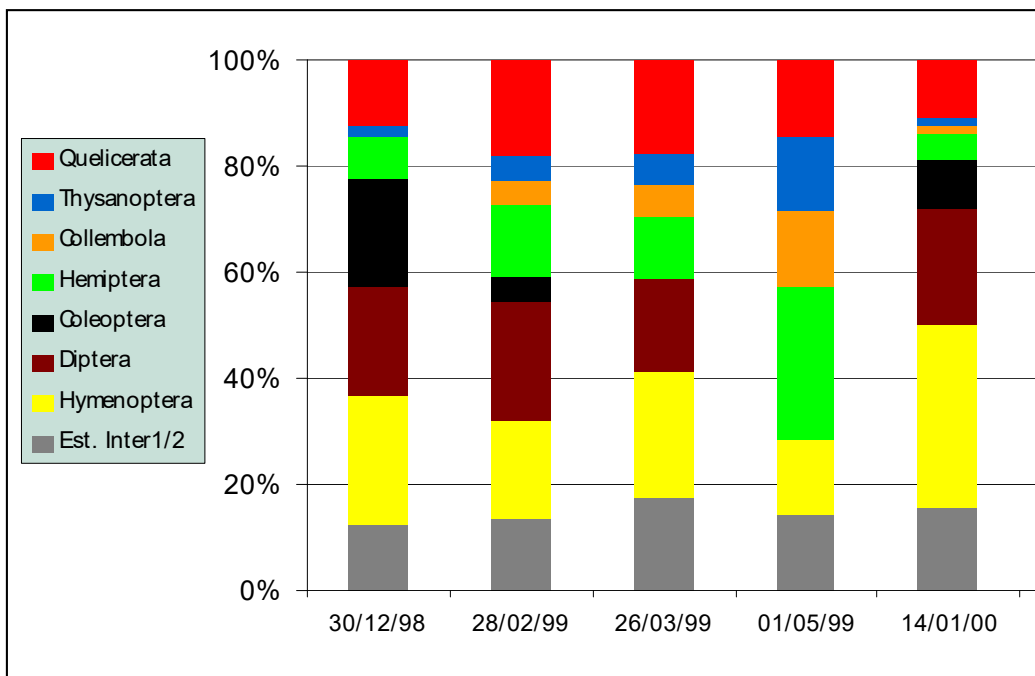


Figura 22. Riqueza taxonómica de los grupos faunísticos de mayor jerarquía asociados a *A. boronioides* a lo largo del período de estudio (Martin, 2001).

Figure 22. Taxonomic richness of most hierarchy fauna groups in *A. boronioides* along the study period (Martin, 2001).

Muchos de los insectos son especialistas **estacionales**, ya que al especializarse en un tejido determinado lo hacen también en un periodo dentro de **la fenología de la planta (Figura 22)**. Por otra parte,

las variaciones climáticas, y fenológicas asociadas a estos cambios influyen de manera negativa en la comunidad de artrópodos y su densidad a lo largo del año.



Figura 22: Comparación del estado fenológico de *A.boronioides* a 870, 1250 y 1420 m s.n.m. (izquierda a derecha), durante el mes de Noviembre (González S., 2002).

Figure 22: Phenological stages of *A.boronioides* a 870, 1250 y 1420 m a.s.l. (left to right) in November (González S., 2002).

2) Altitud (m s. n. m.)

La variación del rendimiento de aceite esencial con la altitud observada es muy probable que sea más bien una consecuencia del estado fenológico de la planta, que a causa de las diferencias en las condiciones climáticas, es distinto en la misma época, en las tres altitudes estudiadas. Esta situación puede observarse claramente en la figura 23, donde se ilustra el estado de floración en 3 etapas muy diferentes a

las tres altitudes, durante el mes de noviembre. Este desfase en la fenología, se traduciría en una diferencia en la biosíntesis de metabolitos secundarios, en una época determinada. De todas maneras la cantidad total de aceites esenciales es similar como se observa en la figura 23 y la composición ligeramente diferente (Figura 24). Asimismo, en el análisis de los insectos presentes en las diferentes altitudes no se observaron diferencias.

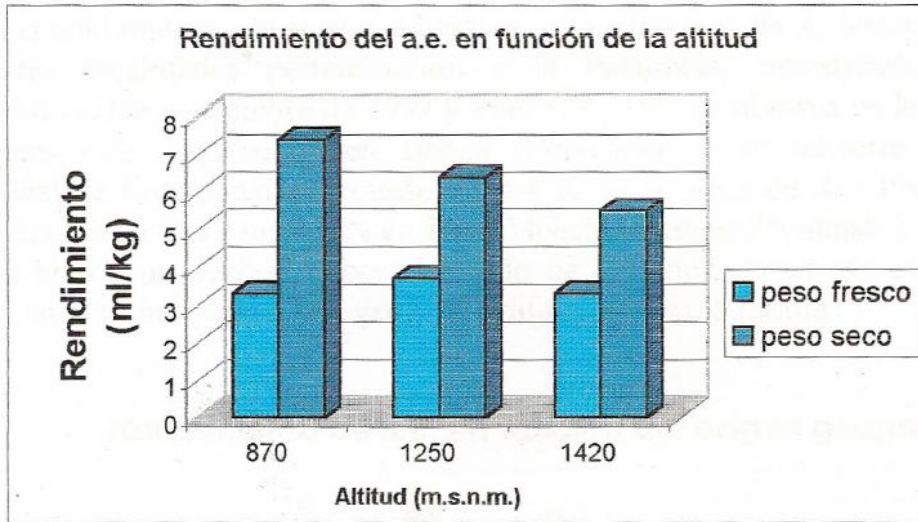


Figura 23. Contenidos de aceites esenciales en función de la altitud en el Cerro La Hoya (González, 2002).

Figure 23. Essential oils from plants at different altitudes in Cerro La Hoya (González, 2002).

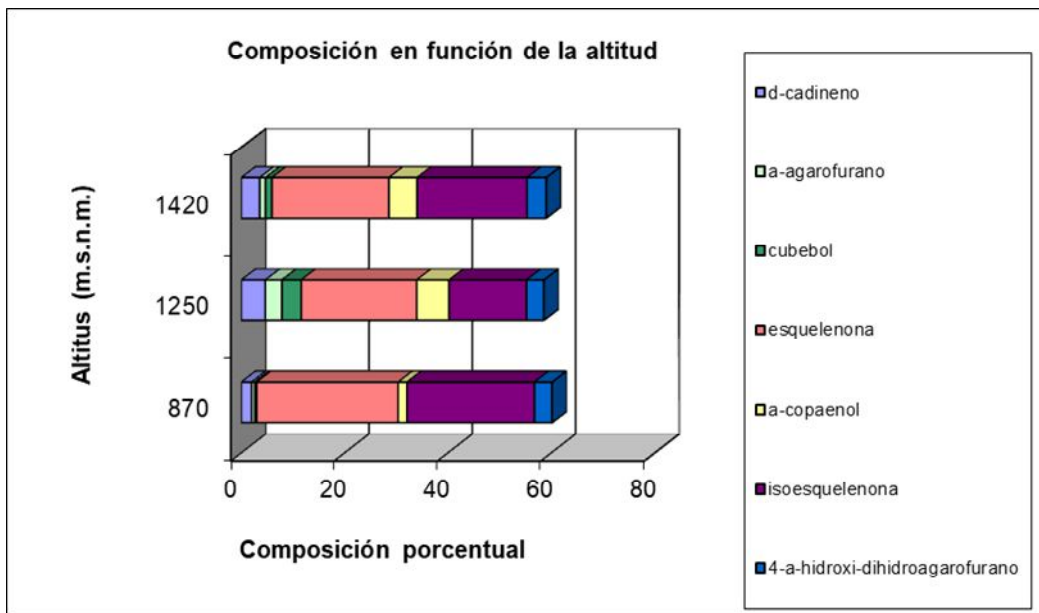


Figura 24. Composición de los aceites esenciales en función de la altitud (González, 2002).

Figure 24. Essential oil composition at different altitudes (González, 2002).

Algunos estudios de distribución de insectos asociados a especies arbustivas muestran que existen ciertos patrones cuando la planta se distribuye a lo largo de un gradiente altitudinal. En general, las plantas que se encuentran a mayor

altura deberían tener una menor riqueza taxonómica y densidad que las que están a menor altura. Martin (2001) no detectó diferencias significativas de riqueza y densidad en el periodo diciembre a enero, aunque esto

probablemente se debió a que en el diseño muestral usado no puede despejarse el efecto del tamaño de la planta. En efecto, al analizar los datos del muestreo de enero (plantas de talla similar), si se halló que la densidad en

el nivel altitudinal inferior fue menor a la de los estratos superiores. En coincidencia con otros trabajos realizados, no se encontró relación entre la altitud y la riqueza taxonómica (Figura 25).

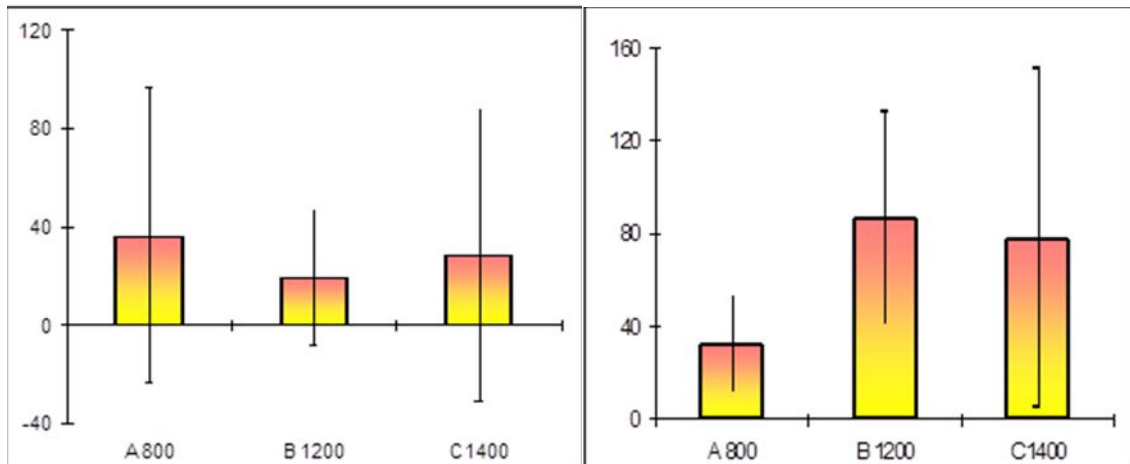


Figura 1.3. Riqueza taxonómica media de artrópodos por planta (todas las tallas) a través del gradiente altitudinal (Período Dic-May) (n=12)

Figura 1.4. Riqueza taxonómica media de artrópodos por planta (talla 100 cm) a través del gradiente altitudinal (Enero) (n=10)

Figura 25. Variabilidad de insectos en *A. boronioides* según altitud según Martin (2001).
Figure 25. Insect variability in relation to altitudes (Martin, 2001).

Las principales especies vegetales acompañantes son ligeramente diferentes, también, siendo más variadas y abundantes a menor altitud: 1420 m s.n.m. se asocia a ñancohuén, abrojo, coirón, neneo y calafate. A 1250 m s.n.m. se asocia a ñancohuén, *Nardophyllum* sp., charcao, coirón, calafate, tabaco del indio y neneo. A

870 m s.n.m. se asocia a palo piche, verbasco, huautro, laura, neneo, abrojo, charcao, retama, lenga, *Nardophyllum* sp., maitén, oenotera, llantén, mamuel choique, alfalfa, cicuta, lupino, ñancohuén, etc.

3) Edad/tamaño de la planta.

La edad de la planta y el tamaño de la planta parecen influir en alguna medida en el rendimiento de aceite esencial, ya que como se observa en la figura 26, es superior en los especímenes más

jóvenes. También, la composición muestra alguna diferencia siendo mayor el porcentaje de α -pineno, δ -cadineno y α -copaen-11-ol en plantas más jóvenes y de menor tamaño (Figura 27).

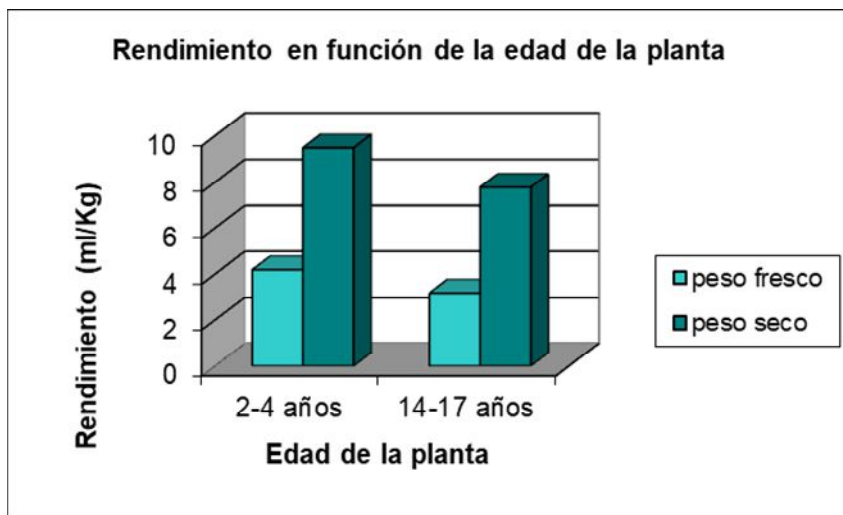


Figura 26. Contenidos de aceites esenciales según la edad de la planta. (González, 2002).

Figure 26. Essential oils in relation to plant ages (González, 2002).

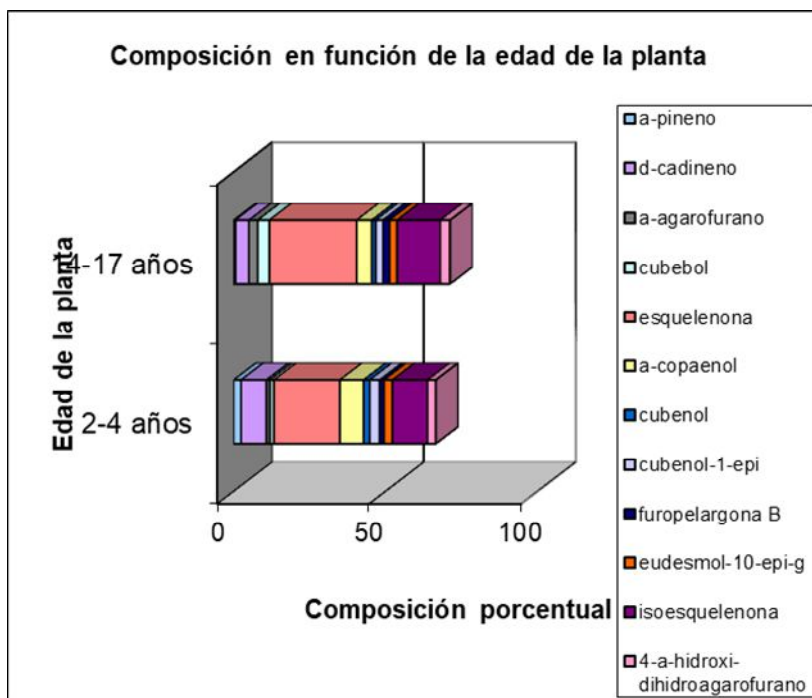


Figura 27. Composición de los aceites esenciales según la edad de la planta (González, 2002).

Figure 27. Essential oils composition in relation to plant ages (González, 2002).

Estos resultados son congruentes con lo encontrado en el estudio de los insectos asociados, ya que las plantas más pequeñas estarían mejor protegidas del ataque por el mayor porcentaje de aceites esenciales, con sus contenidos en mono y sesquiterpenos, entre los que se destacan el α -pineno, δ -cadineno y el eudesmol, de acción insectífuga y/o insecticida. **La densidad y riqueza de artrópodos aumenta con la talla de la planta hospedadora.** Es probable que las diferencias encontradas estén relacionadas con que las mayores tallas tendrían mayor capacidad para soportar o dar refugio a mayor cantidad de especies. Diversos estudios comprueban que existe una importante influencia de la ‘arquitectura de la planta’ hospedera en la riqueza de especies, donde plantas estructuralmente más complejas permiten una mayor diversificación de nichos y, por ende, poseen un equilibrio más grande en el intercambio de especies. Además, en las plantas de mayor talla existen más posibilidades de evadir la competencia interespecífica e intraespecífica, incluyendo predadores y parásitos propios o provenientes de especies vecinas. **Dos atributos de las**

plantas son importantes en los patrones de riqueza y densidad de sus huéspedes: el tamaño, con relación a la expansión del tejido vegetal en distintas disposiciones espaciales; **y la variedad de las estructuras de la planta,** tanto en forma como en persistencia. Todo esto genera un mayor rango de microhábitats disponibles para la colonización de insectos y otros artrópodos, pudiendo incrementar la exposición de la planta, y soportar mayores poblaciones reduciendo las probabilidades de extinción local. Así, **plantas de mayor tamaño** constituyen un parche con **mayor capacidad de ser colonizado por diferentes artrópodos** en busca de un hospedero acorde a sus necesidades alimenticias o de cualquier otro tipo; **y por ende, a la llegada de predadores o parasitoides** que los utilicen como parte de su dieta. Si bien la estructura de los grupos faunísticos parece permanecer con pocas variaciones en las distintas tallas de *A. boronioides*, **la riqueza de especies parece incrementarse a medida que la planta aumenta de tamaño (Figuras 28 y 29).**

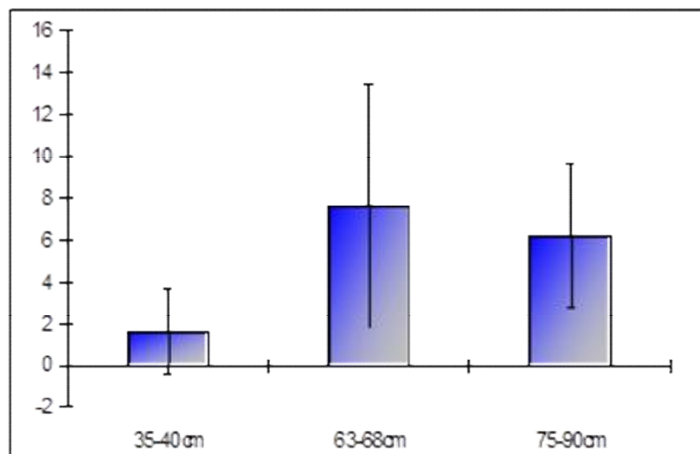


Figura 28. Valores de riqueza específica media según tallas de *A. boronioides* (Martin, 2001).

Figure 28. Species richness related to size in *A. boronioides* (Martin, 2001).

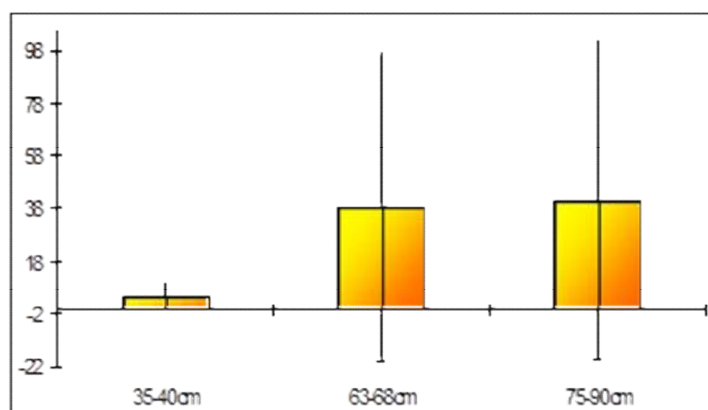


Figura 29. Valores de densidad media de individuos por planta según tallas de *A. boronioides*. (Martin, 2001).

Figure 29. Individual average density related to plant sizes of *A. boronioides*. (Martin, 2001).

4) Fenología

Las condiciones ambientales constituyen una fuerte influencia en las interacciones entre plantas e insectos, el clima y la estacionalidad afectan tanto plantas como los insectos que viven asociados a éstas. El número de especies herbívoras en una planta depende de la variación estacional, tanto en la estructura de la planta (Figura 30)

como en los compuestos químicos que estas poseen. El desarrollo estacional de una planta y la duración de su ciclo de crecimiento pueden ejercer una influencia en el número de especies herbívoras que las explotan como recurso, debido a que estos factores alteran la exposición de la planta al ataque.



Figura 30. Estados fenológicos que transcurren entre octubre y marzo en *A. boronioides*. (González, 2002).

Figure 30. Phenological stages from October to March in *A. boronioides*. (González, 2002).

Si bien *A. boronioides* es una planta siempre verde, existen momentos del año que pueden ser más favorables para el desarrollo de ciertas especies. La mayor densidad tanto de trips (Thysanoptera) como de pulgones se correspondió con la floración de *A. boronioides*, varias larvas de

curculiónidos estuvieron asociadas a sus semillas (Figura 31) y, en algunos casos, se hallaron perforaciones que podrían corresponderse a parasitoides. Esta serie de complejas relaciones permite la coexistencia de varias especies de artrópodos sobre *A. boronioides*.

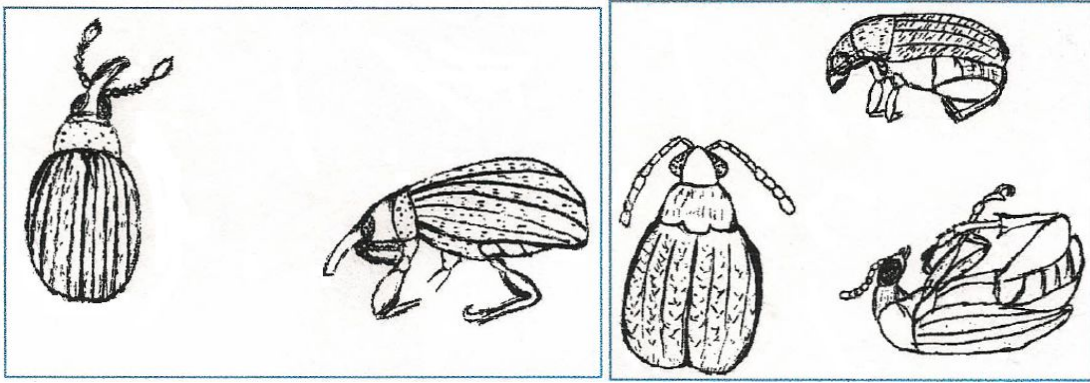


Figura 31. Insectos curculiónidos encontrados en las semillas de *A. boronioides* (González, 2002).
Figure 31. Curculionidae insects found in *A. boronioides* seeds (González, 2002).

5) Latitud

La teoría biogeográfica de islas sugiere que existe una **relación inversa entre la diversidad de especies y la latitud**; sin embargo, no se han realizado estudios que sustenten o refuten esta teoría en comunidades de artrópodos asociados a arbustos a altas latitudes en

Sudamérica y no se han estudiado las poblaciones de *A. boronioides*. Teniendo en cuenta que la arquitectura de la planta cambia con la latitud, esperaríamos encontrar cambios/modificaciones en las comunidades de artrópodos asociados (Figuras 32, 33 y 34).

Comparación de la longitud del raquis



Figura 32. La arquitectura de la planta varía según las condiciones en la que crece y afecta a la presencia de insectos (González, 2015).
Figure 32. The plant architecture varies upon conditions and affects insects presence (González, 2015).



Figura 33. Diferencia en la forma de las glándulas según la latitud donde crece *A. boronioides* (González, 2015).

Figure 33. Shape of glands related to latitude where *A. boronioides* grows (González, 2015).



Figure 34. Diferencia en la cantidad de glándulas según la latitud donde crece *A. boronioides* (González, 2015).

Figure 34. Number of glands difference in relation to latitude where *A. boronioides* grows (González, 2015).

La forma y la cantidad de glándulas son afectadas por la zona donde crece la planta; aparentemente, las condiciones más extremas producen un aumento del volumen y número de glándulas. En el estudio de la cantidad de aceites esenciales, según la zona donde crece, se encontró que en su distribución más

central (e.g., noroeste del Chubut), la planta sintetiza mayor volumen de estos metabolitos secundarios. La composición también es muy afectada por la latitud donde crece la planta, observándose la presencia de mayor contenido de hemiterpenos en los sitios más australes (Figura 35).

Rutas biosintéticas y componentes mayoritarios 2014

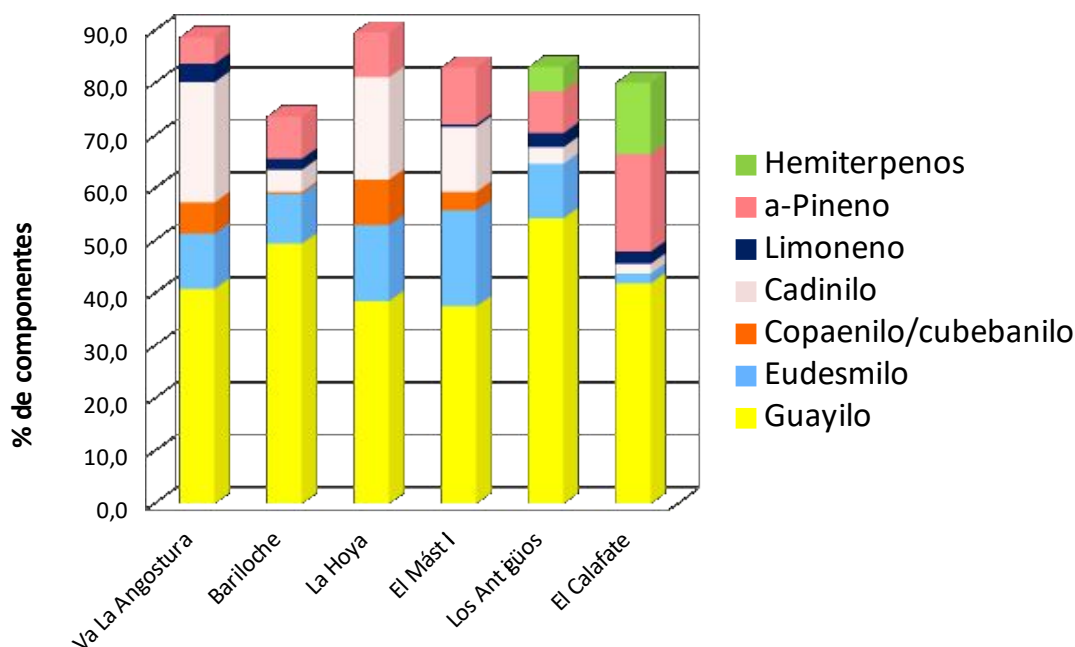


Figura 35. Tipos de compuestos terpenoides encontrados en sitios a diferentes latitudes. Los más australes (Los Antiguos y El Calafate, en Santa Cruz) poseen más hemiterpenos y α -pineno (González, 2015).

Figure 35. Terpenoids types according to latitudes. Southern sites (Los Antiguos and El Calafate, in Santa Cruz, has more hemiterpenes and α -pinene (González, 2015).

Otros aspectos relevantes de la entomofauna asociada a *Adesmia*

Se encontró que la entomofauna asociada a *A. boronioides* presentó una gran diversidad, con resultados

equivalentes a los reportados para la especie cogenérica *Adesmia microphylla*, de distribución mediterránea en Chile. Algunos investigadores han observado que existe

una **relación entre la riqueza taxonómica y el área que ocupa la especie hospedera**. *A. boronioides* se distribuye en Argentina desde el norte de la Provincia del Neuquén hasta la isla grande de Tierra del fuego, por lo que se esperaría encontrar variaciones en la riqueza teniendo en cuenta este gradiente latitudinal. También, es importante a la hora de analizar la riqueza de especies determinar la **aislación taxonómica** de la planta hospedera, ya que **el intercambio de herbívoros** (y predadores y parasitoides asociados) **entre plantas relacionadas a distintos niveles taxonómicos será más fácil** que el intercambio con especies no relacionadas. Esto se basa, **generalmente, en que plantas con una relación taxonómica más cercana son estructural y bioquímicamente más similares** que las que no están tan cerca (Martin, 2001 y literatura allí citada). Mientras algunos autores plantean que esto no influye en el número de especies asociado a una planta, otros sostienen que sí es importante y decisivo a la hora de analizar la riqueza específica. *Adesmia boronioides* posee una serie de **compuestos exclusivos**, principalmente terpenos como la Esquelenona y la Isoesquelenona,

además de otros compuestos que pueden encontrarse en otras especies de la zona pero con proporciones únicas para cada una (González, 2004) (Figura 36). Aunque no se han realizado estudios de entomofauna asociada en plantas de la región, sería esperable que, cuanto más parecida fuera la composición química de las plantas en la comunidad, más parecida sea su comunidad de artrópodos asociada (Ehrlich y Raven, 1964; Becerra 1997). A pesar de la relativamente escasa información acerca de las relaciones que existen entre insectos herbívoros y cómo se han adaptado a **los compuestos químicos de las plantas**, queda claro que estos **modifican la forma en la que los insectos hacen uso de estas y pueden ejercer distinta influencia en su abundancia**. Plantas dotadas de **compuestos químicos inusuales, son con frecuencia, hospederas de un número relativamente grande de insectos especialistas** (Martin, 2001). **Se ha encontrado dos áfidos exclusivos para la especie: *Aphis adesmiae* Delfino y *Uroleucon nahuelhuapense* Nieto Nafría & von Dohlen.**

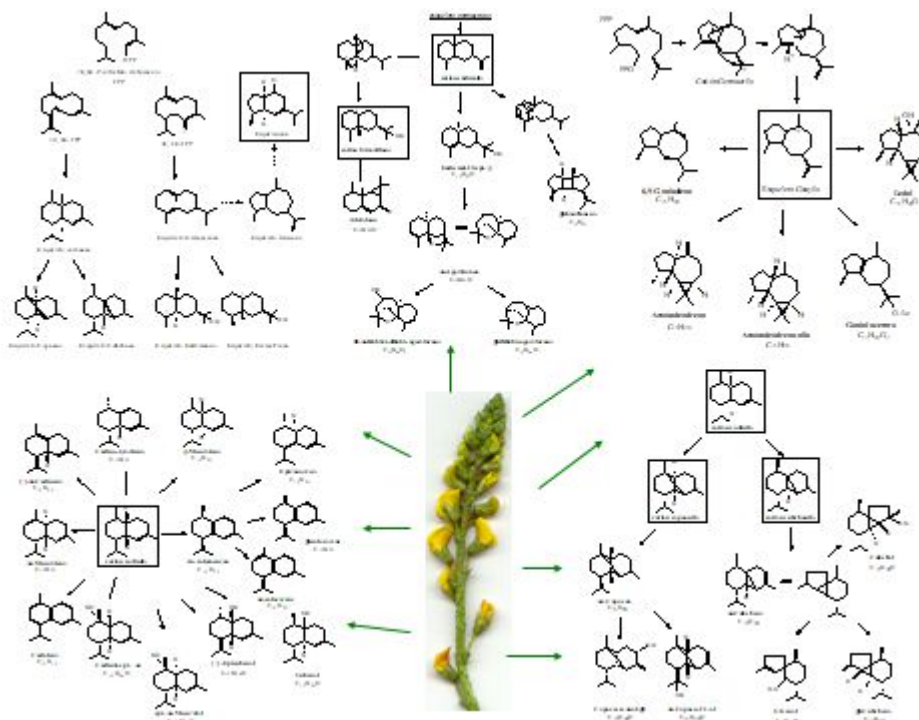


Figura 36. Principales compuestos sesquiterpénicos presentes en el aceite esencial de *A. boronioides*. (González, 2019).

Figure 36. Sesquiterpenes in *A. boronioides* essential oils (González, 2019).

Aphis adesmia es una especie nueva de áfido dentro de una familia (Aphididae) que contiene unas 600 especies, y cuya única planta hospedadora conocida hasta el momento es *A. boronioides*. Se lo encuentra a muy baja altitud en el sur de Argentina y mucho más al norte en la zona andina, en la provincia del Neuquén. Entre ambas localidades, Güer Aike (Santa Cruz) y Paso de Pino Hachado (Neuquén) existen unos 1450 km en línea recta (Delfino *et al.*, 2009). Por otra parte, *A. boronioides* es la única hospedadora del áfido *Uroleucon nahuelhuapense* Nieto Nafria & von Dohlen, que se desarrolla en los tallos

de *A. boronioides* de una población de Villa La Angostura, Neuquén.

En su trabajo de tesis, Martínez (2018) demostró que la heterogeneidad ambiental representada por la arquitectura de especies arbustivas representativas de un área, es uno de los factores más importantes en la estructuración de los ensambles de artrópodos de la región patagónica. Los insectos y arácnidos en la mayoría de los ecosistemas terrestres, intervienen en procesos claves como por ejemplo la polinización, la dispersión de semillas y los ciclos de nutrientes. Sin embargo, la importancia ecológica de los artrópodos se incrementa aún más en los ambientes

áridos, ya que al ser menos sensibles a la escasa disponibilidad de agua y a las condiciones térmicas extremas que otros grupos animales, constituyen una de las principales vías para el flujo de materia y energía. Al mismo tiempo, las comunidades de artrópodos configuran una excelente herramienta de monitoreo ambiental ya que, además de ser diversas y fáciles de muestrear, presentan ciclos de vidas cortos y altas tasas reproductivas. Esto minimiza el período de tiempo entre los cambios ambientales y la respuesta de las poblaciones a las nuevas condiciones (Baldi *et al.*, 2017).

Los resultados de un estudio de interacción planta-insecto indican que solo polinizadores del orden Hymenoptera visitan *Adesmia bijuga*. El conjunto de polinizadores no muestra variación temporal durante la estación de floración, siendo *Bombus dahlbomii* el visitante más frecuente. Bajo condiciones naturales, las poblaciones de *A. bijuga* existen en sistemas fragmentados y las abejas introducidas *Apis mellifera*, *Bombus ruderatus* y *Bombus terrestris* son los principales visitantes de las flores. De todas maneras, el endémico *Bombus dahlbomii* visitó *A. bijuga* 9 veces más que las especies introducidas, mostrando mayor especificidad.

CONCLUSION FINAL

Son muchas las variables que influyen en la interacción planta-insecto, entre las que se incluyen los grupos fitoquímicos producidos por las plantas, taxa de insectos, estacionalidad, estado fenológico, especies botánicas asociadas, altitud, latitud, clima, etc. Aunque es difícil poder sacar conclusiones con tantos aspectos a tener en cuenta, se han intentado establecer algunos parámetros que influyen en la relación *Adesmia*/insectos, incluyendo muchos datos experimentales originales, realizados por los autores y otros colegas. Se ha reportado la coevolución a través de los ejemplos de dos especies de áfidos, *Aphis adesmiae* y *Uroleucon nahuelhuapense* exclusivos en *A. boronioides*. La visita a *A. bijuga* de un abejorro nativo, *Bombus dahlbomii* nueve veces superior a los registrados para abejas y abejorros exóticos. Exactamente lo contrario a lo que sucede con *A. boronioides* y la exótica *Apis mellifera*, que no visita a esta nativa.

Podemos mencionar, además de esto, la existencia de una “propiedad emergente” como es *el olor de la planta*, que se genera por la presencia de cantidades importantes de compuestos volátiles. El aroma de una mezcla nunca puede predecirse a partir

del olor de sus componentes individuales, un principio básico del arte y la ciencia de la perfumería. Es así como la interacción insecto-planta determina nuevas combinaciones y proporciones en los terpenoides volátiles y, en consecuencia, se generan variantes en el aroma de esta especie que sin embargo mantiene cierta cualidad única, dulce, balsámica e intensa, que la caracteriza.

BIBLIOGRAFÍA

Akula, R. & Ravishankar, G.A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Sign. & Beh.*, **6**(11): 1720-1731.

Ávalos García, A. & Pérez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología) Serie Fisiología Vegetal*, **2**(3):119-145.

Baldi, R., Cheli, G., Udrizar Sauthier, D.E., Gatto, A., Pazos, G.E. & Avila, L. 2017. Animal Diversity, Distribution and Conservation. En: P. Bouza y A. Bilmes (eds). Springer Intern. Publ. 263-303.

Becerra, J.X. 1997. Insects on Plants: Macroevolutionary Chemical Trends in Host Use. *Science* **276**: 253-256.

Delfino, M, Monelos, L., Peri, P. & Buffa, L. 2009. A new species of *Aphis* (Hemiptera:

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a los docentes del curso de posgrado Bioquímica Ecológica por la propuesta de este trabajo que brindó la oportunidad de integrar muchos aspectos que habían sido estudiados y analizados aisladamente y que pudieron confluir en una nueva mirada. Al Dr. Nieto Nafría por sus amables comentarios y por permitir el uso de ilustraciones presentes en sendas publicaciones y a Zootaxa www.mapress.com/j/zt por la autorización para el uso de la figura 15.

Aphididae) from South Patagonia. *Neotrop. entomol.*, **38**, 3.

Davis, R.H. & Nahrstedt H. 1987. Biosynthesis of cyanogenic glucosides in butterflies and moths. *Insect Biochem.*, **17**(5): 689-693.

Ehrlich, P.R. y Raven, P.H. 1964. Butterflies and Plants: A Study in Coevolution. *Evolution* **18**: 586-608.

Gastaldi, B., Marino, G., Assef, Y. & González, S. 2018. Nutraceutical Properties of Herbal Infusions from Six Native Plants of Argentine Patagonia. *Plant Foods Hum. Nutr.* <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0680-3>.

González S. 2002. *Adesmia boronioides* Hook. f.: una especie aromática y medicinal de la Patagonia Tesis de doctorado de la UBA.

González S., Bandoni, A., van Baren, C., Di Leo Lira, P., Cerda-García-Rojas, C. & Joseph-Nathan, P. 2004. The Essential Oil of the Aerial

- Parts of *Adesmia boronioides* Hook. F. *Journal Of Ess. Oil Res.* **16**: 513-516.
- González, S., Houghton, P. & Hoult, J. 2003. The activity against leukocyte eicosanoid generation of essential oil and polar fractions of *Adesmia boronioides* Hook.f. *Phytoth. Res.*, **17**(3): 290-293.
- González, S. & Molares, S. 2004. "Plantas Medicinales utilizadas en comunidades rurales del Chubut, Patagonia-Argentina". *BLACPMA*, **3**(3):58-62.
- González, S.B., Gastaldi, B., Silva Sofrás, F., van Baren C., Di Leo Lira, P., Retta D. & Bandoni, A. 2016. Diversidad química en una especie aromática y medicinal endémica de Patagonia. *Dominguezia* **32**(2): 89-90.
- Hartmann, T. 1996. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomol. Exp. et Appl.*, **80**: 177-188.
- Instituto Darwinion, página web. <http://www.darwin.edu.ar/> consultado última vez 31/08/2018.
- Levin, S.A. 2000. Multiple scales and the maintenance of biodiversity. *Ecosystems*, **3**: 498-506.
- Martin, G.M. 2001. Entomofauna asociada a *Adesmia boronioides* Hook. f. en el área del cerro La Hoya (N. de la ciudad de Esquel). Tesis de Licenciatura FCN-UNPSJB. 41pp.
- Martínez, F. 2018. Ensamblajes de artrópodos asociados a arbustos nativos del noreste de la Patagonia: su relación con la complejidad estructural de la vegetación y el pastoreo ovino. Trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Naturales en Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata. FCNyM-UNLP. 135pp.
- Mayr, E. 1982. *The Growth of Biological Thought*. Belknap, Cambridge. 974 pp.
- Mooney, K.A., Pratt, R.T. & Singer, M.S. 2012. The Tri-Trophic Interactions Hypothesis: Interactive Effects of Host Plant Quality, Diet Breadth and Natural Enemies on Herbivores. *PLoS ONE* **7.4**: e34403.
- Nieto Nafría, J., Ortega, J., von dohlen, C., Mier Durante, M.P., García-Tejero, S., López Ciruelos, S. & Fuertes Fernández, P. 2016. Las especies de *Aphis* (Hemiptera, Aphididae) que viven sobre *Adesmia* (Fabales, Fabaceae) en Argentina y Chile, con cuatro especies nuevas. *Boln. Asoc. esp. Ent.*, **40**(3-4): 351-391.
- Nafría, J.M.N., Von, C.D., Moreno-Gonzalez, V., Ortego, J. & Durante, M.P.M. 2019. The species of *Uroleucon* (Hemiptera: Aphididae) living on *Adesmia* (Fabaceae) in Argentina, with the description of a new species. *Zootaxa*, **4555**(4): 561-572.
- Petinatti Pavarini, D., Petinatti Pavarini, S., Niehues, M. & Pepporine Lopes, N. 2012. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Sci. and Tech.*, **176**: 5-16.
- Ponge, J. 2005. Emergent properties from organisms to ecosystems: towards a realistic approach. *Biol. Rev.*, **80**: 403-411.
- Raffaele, E., de Torres Curth, M., Morales, C.L. & Kitzberger, T. 2014. Ecología e historia natural de la Patagonia Andina: un cuarto de siglo de investigación en biogeografía, ecología y conservación - 1a ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Fundación de Historia Natural Félix de Azara. 256 pp.
- Richards, A.J. & Fletcher, A. 2002. The effects of altitude, aspect, grazing and time on the proportion of cyanogenics in neighbouring populations of *Trifolium repens* L. (white clover). *Heredity*, **88**: 432-436.

- Schowalter, T.D. 2016. Insect ecology: an ecosystem approach. 4th edition. San Diego: Elsevier Academic Press. 737 pp.
- Silva Sofrás, F.M. 2016. Metabolitos secundarios presentes en *Adesmia boronioides* Hook.f.: análisis de su variabilidad en diferentes sitios de la Patagonia Argentina. Tesis de Licenciatura. FCN-UNPSJB. 68 pp.
- Ulibarri, E.A. & Burkart, A. 2000. Sinopsis de las especies de *Adesmia* (Leguminosae, Adesmieae) de la Argentina. *Darwiniana*. **38**(1-2): 59-126.
- Wink, M. 2006. Importance of plant secondary metabolites for protection against insects and microbial infections. *Adv. in Phytomed.*, **3**: 251-268.
- Falcone Ferreyra, M.L., Rius, S. & Casati, P. 2012. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front. in Plant Sci.*, **3**(222): 1-15.

Desarrollo embrionario y larval del erizo de mar verde *Arbacia dufresnii* (Echinodermata: Echinoidea).

Embryonic and larval development of the green sea urchin of *Arbacia dufresnii* (Echinodermata: Echinoidea).

Jimena Pía Fernández^{1,2*}, Lucía Epherra^{1,2}, Lucas Sepúlveda^{1,2}, Tamara Rubilar^{1,2}

¹ LOBio (Laboratorio de Oceanografía Biológica) - CESIMAR - CCT CENPAT - CONICET.

² Instituto Patagónico el Mar (IPAM). Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Sede Puerto Madryn. Argentina

* jpfernandez@cenpat-conicet.gob.ar

RESUMEN

El desarrollo embrionario y larval de los erizos de mar ha sido ampliamente estudiado. Sin embargo no existe una descripción detallada del erizo de mar verde *Arbacia dufresnii*, el más abundante del Mar Argentino. Este trabajo describe las condiciones para obtener altos porcentajes de fecundación en el laboratorio y luego el desarrollo embrionario y larval. El desarrollo encontrado no varía de lo descrito en bibliografía para otras especies del género, sin embargo sí se encuentra un patrón en la coloración de los embriones y las larvas. La descripción del desarrollo de *A. dufresnii* sienta bases para posteriores estudios enfocados en larvas de erizos de mar en Argentina, los cuales son actualmente muy escasos.

PALABRAS CLAVES: *Arbacia dufresnii*, Echinoidea, embriones, fecundación, larvas.

ABSTRACT

Sea urchin embryonic and larval development has been widely studied. However, there is no detailed description of the green sea urchin *Arbacia dufresnii*, the most abundant of the Argentine Sea. This study describes the laboratory conditions in order to obtain high fecundation succes. It also describes the embryonic and larval development. The development described did not vary from other species, however there was a pattern in the coloration of the embryos and larvae. The description of the development of *A. dufresnii* provides a baseline for further studies focused on larvae of sea urchins in Argentina.

KEY WORDS: *Arbacia dufresnii*, Echinoidea, embryo, fertilization, larvae.

INTRODUCCION

Los embriones de equinodermos, en especial los provenientes de estrellas de mar y erizos de mar, han sido estudiados por más de 170 años. Como resultado de esta larga trayectoria, los equinodermos han contribuido al entendimiento de muchos mecanismos del desarrollo embrionario (Rubilar y Crespi-Abril, 2017). Un ejemplo clásico son los estudios de la fecundación y el desarrollo embrionario que se iniciaron utilizando las gametas de erizos de mar (Metchnikoff, 1893), y posteriormente, la descripción de la morfología y la bioquímica de los estadios tempranos del desarrollo (Williams y Anderson, 1975). Actualmente, este modelo animal es frecuentemente utilizado para estudios de genética molecular (Hinman y Burke, 2018). En especial el género *Arbacia* ha sido utilizado para diversos estudios embrionarios (Giudice, 1986). Si bien el desarrollo embrionario y larval no varía demasiado entre especies de un mismo género (Giudice, 1986), la descripción de *Arbacia dufresnii*, especie que habita nuestras costas patagónicas, aún no se ha descrito y es de utilidad para muchos estudios centrados en equinodermos y también en zooplancton.

El erizo de mar *A. dufresnii* (Blainville, 1825) es abundante en el Mar Argentino

y el Chileno, y es la única especie del género *Arbacia* que habita ambas costas de Sudamérica (Lessios *et al.*, 2012). Se distribuye desde la desembocadura del Río de la Plata, Argentina (35°S) hasta Puerto Montt, Chile (42°S), incluyendo la Antártida e islas Malvinas (Bernasconi, 1966). Ocupa un rango de profundidades que va desde los 0 a los 315 m (Brogger *et al.*, 2013), y regularmente se lo encuentra en zonas de sedimentos gruesos y sustratos duros (Zaixso y Lizarralde, 2000). Los erizos de mar de este género poseen una larva planctotrófica que habita en la columna de agua y se alimenta de microalgas (Harvey, 1956).

En los últimos años, *A. dufresnii* ha sido objeto de varios estudios científicos. En la costa de la patagónica argentina, se han realizado estudios sobre aspectos generales de la dieta (Penchaszadeh y Lawrence, 1999; Castro, 2014), abundancia (Brogger *et al.*, 2013; Zaixso y Lizarralde, 2000; Epherra *et al.*, 2017), ciclo reproductivo (Brogger *et al.*, 2010; Epherra *et al.*, 2015), composición gonadal (Parra *et al.*, 2015; Zárate *et al.*, 2016), su relación con el alga *Undaria pinnatifida* (Teso *et al.*, 2009; Castro, 2014; Epherra, 2016) y su potencial acuícola (Rubilar *et al.*, 2016). En las costas chilenas, se han realizado estudios

sobre la dieta del erizo en bancos de algas (Vásquez *et al.*, 1984), su distribución (Larrain *et al.*, 1999), su rol ecológico (Newcombe *et al.*, 2012) y la respuesta a la acidificación de su larva (Catarino *et al.*, 2012). Sin embargo, sobre el desarrollo embrionario y larval de *A. dufresnii* sólo existen algunas observaciones parciales (Bernasconi 1942, Brogger, 2005) sin una descripción. Este trabajo tiene como objetivo describir el desarrollo embrionario y larval del erizo verde *A. dufresnii* para que pueda ser utilizado en futuros estudios sobre la especie y ayude a comprender su biología y distribución.

MATERIALES Y METODOS

El sitio seleccionado para obtener los ejemplares de *Arbacia dufresnii* en el Golfo Nuevo fue Punta Cuevas (42°46'44''S, 64°59'52''O). En febrero de 2017, cuando se encuentran desovando en la naturaleza (Epherra *et al.*, 2015), individuos sexualmente maduros (diámetro de caparazón mayor a 25 mm) fueron capturados y trasladados al Acuario Experimental del Centro Nacional Patagónico.

Dado que para realizar una fecundación en condiciones controladas, la cantidad de esperma por volumen de líquido y/o por cantidad de huevos varía según la especie utilizada (Giudice, 1986), se

puso a prueba la eficiencia de la fecundación con respecto a las concentraciones de gametas. Para ello, se indujo el desove de tres hembras y tres machos con 0,5 ml de KCl 5% en agua de mar filtrada y esterilizada con UV. Las gametas femeninas fueron recogidas invirtiendo a los erizos de mar sobre un recipiente con agua de mar (filtrada y esterilizada con UV) para evitar dañarlas al entrar en contacto con el aire. Luego se colocaron en un único recipiente y se cuantificaron bajo lupa binocular Carl Zeiss Stemi 2000, en cámara de Bogorov (promedio de 3 alícuotas de 100 µl). Las gametas masculinas fueron recogidas en seco en un único recipiente y mantenidas en frío hasta su utilización, a fin de preservar su viabilidad. La fecundación se realizó bajo condiciones controladas y a una temperatura de 17°C, similar a la temperatura de fondo media para el mes de febrero (Pisoni *et al.*, 2017). Se combinaron tres concentraciones de huevos (N = 500.000; 50.000; 5.000) en vasos de precipitados con 100 ml de agua de mar (filtrada y esterilizada con UV) y se fecundaron con tres concentraciones de esperma (1:1000; 1:4000; 1:100.000 v/v). Transcurridos 30 minutos, se extrajeron tres alícuotas de 100 µl de cada uno de los nueve tratamientos y se observaron en microscopio de campo claro. Se consideraron huevos

fecundados a los que presentaron una membrana de fecundación visible y/o un cono de fecundación. Los huevos dañados y los que no formaron dicha membrana se consideraron no fecundados. El porcentaje de fecundación (F) se calculó según la fórmula:

$$F = (\text{huevos fecundados/huevos totales}) * 100$$

Una vez establecida la concentración de gametas que presenta mayor eficiencia para la fecundación, se procedió a desovar cinco hembras y tres machos, y se realizó la fecundación de las mismas. Los organismos se mantuvieron bajo condiciones controladas de cultivo, a una temperatura de 17°C, aireación

constante y suave, cambios del 50% del agua cada 72 hs, y alimentación periódica a partir de los 4 días post-fecundación (dpf) con una mezcla de microalgas (mix de *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oculata*; concentración: 10⁵ células/ml).

Se identificaron los diferentes estadios del desarrollo embrionario de acuerdo a Harvey (1956) a tiempos determinados (30 minutos, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 30 horas y 48 horas). Entre los 2 y los 22 dpf, las larvas se fotografiaron *in vivo* con un microscopio de campo claro Leica DM5200, y se midió el crecimiento larval utilizando como indicador el largo del cuerpo (LC) (Figura 1).

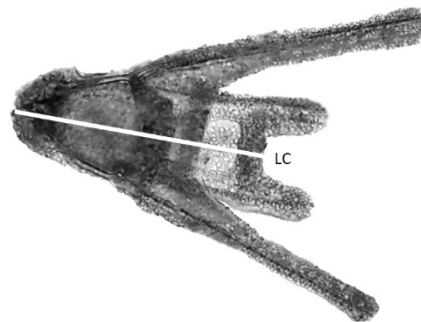


Figura 1. Medida tomada en las larvas de *Arbacia dufresnii*. LC: Largo Cuerpo. La escala equivale a 100 µm.

Figure 1. Measure taken in the larvae of *Arbacia dufresnii*. LC: Body Length. The scale is equivalent to 100 µm.

RESULTADOS

Si bien, en la mayoría de las combinaciones de concentraciones de huevos y espermatozoides se obtuvo gran cantidad de huevos fecundados (Tabla I), la observación del desarrollo embrionario al cabo de 3 hs, permitió diferenciar la calidad de los mismos.

En los tratamientos con mayor cantidad de huevos (500.000 huevos /100 ml), los porcentajes de fecundación fueron los más bajos y luego de 3 hs, se observó una gran cantidad de huevos en degradación, embriones asincrónicos y/o con desarrollo anormal. En los tratamientos con concentraciones intermedias de huevos (50.000 huevos/100 ml) se obtuvieron porcentajes muy altos de fecundación, incluso con la concentración más baja de esperma. Sin embargo, la observación del desarrollo mostró embriones normales solo en el tratamiento con baja concentración de esperma (1:100.000 v/v), y embriones anormales y asincrónicos en los otros dos casos. En los tratamientos con baja cantidad de huevos, los porcentajes de fecundación fueron altos en todas las condiciones. Al cabo de 3 hs, pudieron observarse embriones sincrónicos en gran proporción en los estadios de 4 y 8 células. En especial en el tratamiento con

baja concentración de esperma se observó gran cantidad de organismos normales, mientras que en los tratamientos con concentraciones alta y media de esperma se encontraron también embriones con desarrollo anormal y células apoptóticas.

Por lo tanto, las concentraciones alta y media de esperma utilizadas (1:1000 y 1:4000 v/v), mostraron un alto porcentaje de fecundación, pero también una gran proporción de eventos de poliespermia que puede evidenciarse por la gran cantidad de embriones anormales observados. Asimismo, las concentraciones alta y media de huevos, mostraron gran cantidad de células en degradación, asincronía en el desarrollo embrionario y una coloración ámbar presente en el medio líquido, posiblemente por la gran cantidad de sustancias metabólicas disueltas en el medio. El tratamiento con la menor concentración de esperma (1:100.000 v/v) y la menor cantidad de huevos (5.000 huevos/100 ml), mostró un alto porcentaje de fecundación junto a la mayor proporción de embriones normales y sincrónicos, siendo éste último la mejor combinación hallada para este ensayo.

Concentración de esperma	Cantidad de huevos		
	H1 = 500.000 huevos /100 ml	H2 = 50.000 huevos/100 ml	H3 = 5.000 huevos/100 ml
A = 1:1000 v/v	F = 69%. Presencia de embriones anormales y asincrónicos; células en degradación; coloración ámbar.	F = 98%. Presencia de embriones anormales y asincrónicos; coloración ámbar.	F = 100%. Presencia de embriones anormales.
	F = 32,9%. Presencia de embriones anormales y asincrónicos; células en degradación; coloración ámbar.	F = 98,4%. Presencia de embriones anormales y asincrónicos; coloración ámbar.	F = 100%. Presencia de embriones anormales.
B = 1:4000 v/v	F = 18,9%. Presencia de embriones asincrónicos; células en degradación; coloración ámbar.	F = 99,7%. Presencia de embriones normales y anormales; embriones asincrónicos.	F = 89%. Gran proporción de embriones normales y sincrónicos.
	F = 18,9%. Presencia de embriones asincrónicos; células en degradación; coloración ámbar.	F = 99,7%. Presencia de embriones normales y anormales; embriones asincrónicos.	F = 89%. Gran proporción de embriones normales y sincrónicos.

Tabla I. Efecto de la concentración de gametas sobre el porcentaje y calidad de la fecundación en *Arbacia dufresnii*.

Table I. Effect of the concentration of gametes on the percentage and quality of fertilization in *Arbacia dufresnii*.

El desarrollo embrionario y larval de *A. dufresnii* mostró los estadios esperados. Los huevos recién desovados son de un color púrpura fuerte al igual que otras especies del mismo género y miden $56,25 \pm 10,63 \mu\text{m}$. La fecundación se detectó por la formación del cono de fertilización, la membrana de fertilización y el significativo aumento de tamaño a $62,64 \pm 12,08 \mu\text{m}$ que se mantuvo casi constante hasta el estadio de gástrula. La segmentación es holoblástica radial pasando por los estadios de 2 células, 4 células, 8 células,

y sucesivamente hasta alcanzar el estadio mórula de 64 células, en el que se observó una estructura compacta de células. Posteriormente, en el estadio de blástula se hace evidente una cavidad o blastocele en el centro del embrión. Las blástulas eclosionan de la membrana de fecundación y desarrollan cilios que les permiten nadar libremente, por lo que comienzan a ocupar el espacio de la columna de agua y se separan del fondo. Luego, aparecen las primeras gástrulas que se distinguen por la formación de un orificio o blastoporo que dará origen al

arquenterón o tubo digestivo primitivo. Las larvas prisma aparecen cuando las gástrulas comienzan a elongarse en el eje dorso ventral otorgándoles su característica forma triangular. Asimismo, aparece también una banda ciliar que rodea el perímetro de la misma y cambia el sentido del nado (Figura 2). Este último estadio se observó por un periodo de tiempo muy breve, y a partir de este momento se hizo evidente el crecimiento en el cuerpo de las larvas (Tabla II).

A partir de los 2 días post fecundación (dpf) el organismo se encuentra en estadio de larva *pluteus* de dos brazos, y que se evidencia por la aparición de dos pequeñas protuberancias que se elongan desde la zona ventral y darán origen a los brazos post orales. Otra característica importante de este periodo es la formación del lóbulo oral que incluye al estomodeo y a la parte anterior del esófago, que junto a la maduración del tubo digestivo, le permitirán al organismo alimentarse a partir de los 4 dpf. El segundo par de brazos o brazos

pre orales, comienza a desarrollarse desde la zona dorsal a partir de los 6 dpf, pasando a llamarse ahora larva *pluteus* de cuatro brazos. Las larvas continúan creciendo y a los 12 dpf aparecen los primordios del tercer par de brazos en la zona media de la larva. Por último, aparece el cuarto par de brazos en la zona posterior de la misma.

Desde el estadio prisma y a medida que el organismo crece, las espículas se extienden a lo largo de los brazos post orales, pre orales, dorsal y ventralmente formando el esqueleto de la larva. Otro punto destacable, es la pigmentación que es muy abundante en el huevo y a lo largo del desarrollo va reduciendo su distribución y se hace cada vez más escasa, concentrándose en los extremos de los brazos y la zona posterior de la larva entre los 7 y 14 dpf, hasta hacerse casi imperceptible en los últimos días documentados. Asimismo, es notable el crecimiento de la larva que duplica el tamaño de su cuerpo entre los 2 y 22 dpf (Figura 3; Tabla II).

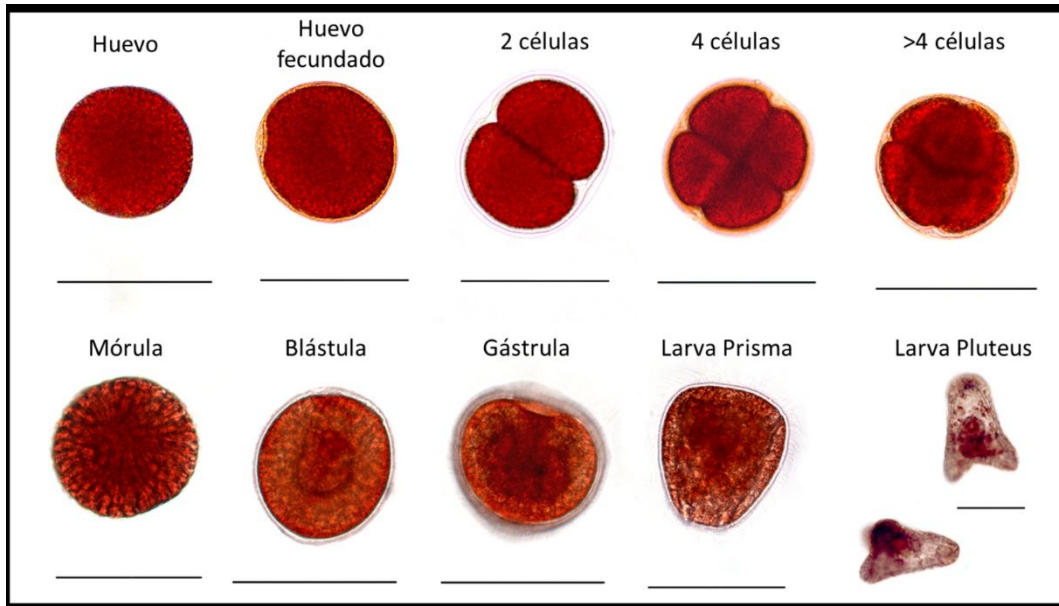


Figura 2. Desarrollo embrionario de *Arbacia dufresnii*. La escala equivale a 100 μ m.
Figure 2. Embryonic development of *Arbacia dufresnii*. The scale is equivalent to 100 μ m.

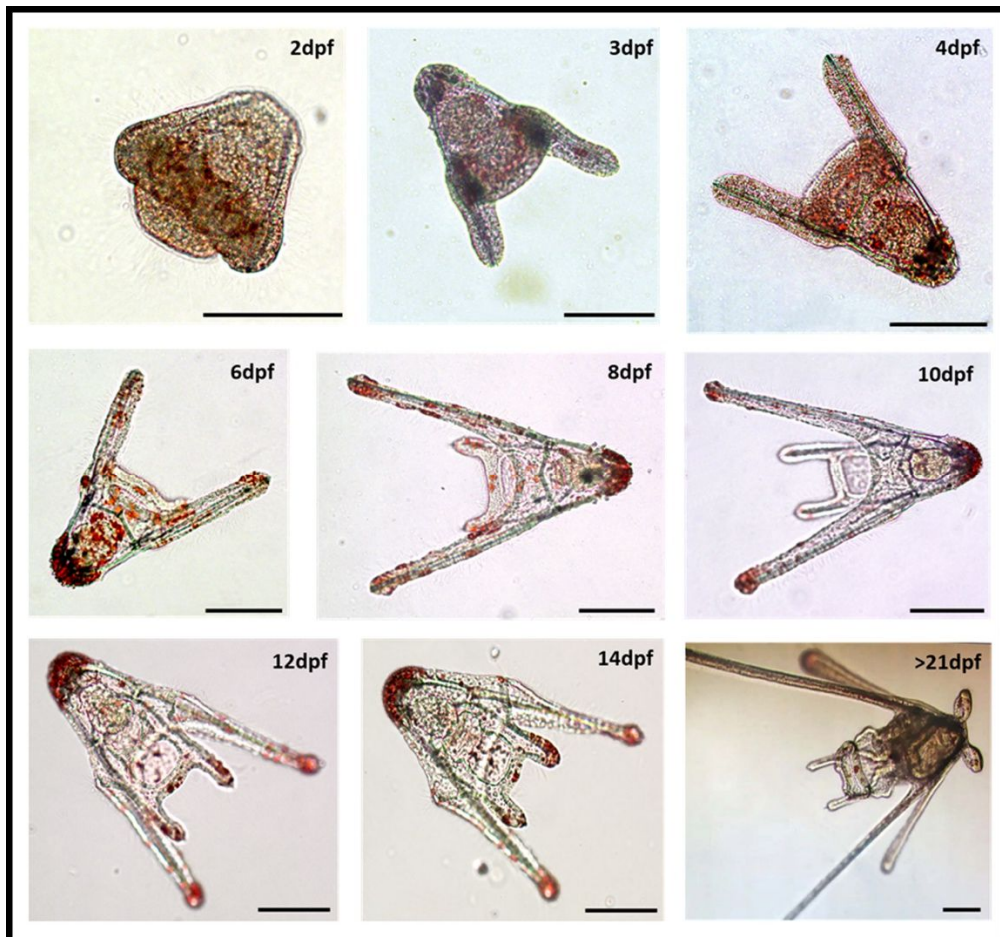


Figura 3. Desarrollo larval de *Arbacia dufresnii* desde los 2 días hasta más de 21 días post fecundación. La escala equivale a 100 μ m.
Figure 3. Larval development of *Arbacia dufresnii* since day 2 until 21 days post fertilization. The scale is equivalent to 100 μ m.

Día	Estadio	Largo del cuerpo (LC)		
2	<i>Pluteus</i> 2-brazos	80,91	±	6,63
3	<i>Pluteus</i> 2-brazos	99,28	±	10,50
4	<i>Pluteus</i> 2-brazos	117,92	±	6,00
7	<i>Pluteus</i> 4-brazos	122,00	±	11,88
10	<i>Pluteus</i> 4-brazos	132,79	±	18,21
13	<i>Pluteus</i> 6-brazos	124,84	±	19,96
16	<i>Pluteus</i> 6-brazos	110,15	±	20,24
19	<i>Pluteus</i> 6-brazos	142,43	±	40,87
>22	<i>Pluteus</i> 8-brazos	152,16	±	47,31

Tabla II. Crecimiento en μm del cuerpo de la larva de *Arbacia dufresnii*.
Table II. Growth in μm of the larval body of *Arbacia dufresnii*.

DISCUSION

A pesar de que el desarrollo de *Arbacia lixula* ha sido ampliamente estudiado (Gianguzza y Bonaviri, 2013) y de que se han realizado gran cantidad de estudios sobre *Arbacia dufresnii*, casi no existen descripciones sobre el desarrollo embrionario y larval de esta especie, a excepción de los trabajos de Bernasconi, 1942 y Brogger, 2005. De acuerdo a las observaciones realizadas, el desarrollo observado en *A. dufresnii* no difiere del desarrollo descrito para otras especies de erizos de mar (Harvey, 1956; Giudice,

1986; Gilbert, 2005), sin embargo, el tamaño del huevo de *A. dufresnii* es pequeño en comparación con otras especies (Strathmann, 1987; Pearse y Cameron., 1991; Fotz *et al.*, 2004). En el ambiente natural, el tamaño del huevo de los erizos de mar influye en la tasa de fecundación, dado que huevos de mayor tamaño poseen una mayor superficie para que los espermatozoides puedan fecundarlos (Levitan *et al.*, 1991). En condiciones controladas, los resultados muestran que altas cantidades de huevos por volumen de agua de mar generan

gran cantidad de células en degradación y embriones asincrónicos, probablemente debido al aplastamiento entre las células, la gran cantidad de sustancias metabólicas disueltas en el medio y/o por una fecundación ineficaz y/o asincrónica. También es necesario considerar la concentración de espermatozoides, altas concentraciones generan poliespermia y, por lo tanto, embriones anormales que resultan inviábiles; y muy bajas concentraciones, podrían dejar huevos sin fecundar o generar asincronía (Gilbert, 2005). En este trabajo se encontró que la mejor condición establece pocos huevos por ml de agua de mar (50) y una dilución de espermatozoides de 1:100.000 v/v. En *Strongylocentrotus droebachiensis*, la media del diámetro del huevo es de 150 µm. En esta especie se describieron las fecundaciones más altas (superiores al 80%) con una concentración de 30 huevos/ml y con diluciones de esperma de 1:1.000.000 v/v (Pennington, 1985). En *Strongylocentrotus intermedius*, la media del diámetro del huevo es de 85 µm y se utiliza una dilución de esperma de 1:100.000 v/v con una concentración de 70 huevos por mililitro (Unuma *et al.*, 2015). De esta forma, notamos que, en las fecundaciones bajo condiciones controladas, el número de huevos por mililitro que garantiza un desarrollo

normal pareciera tener relación con el tamaño del mismo. A su vez, la dilución de esperma óptima para cada especie se ve afectada por el tamaño del huevo, siendo los huevos de mayor tamaño los que necesitan diluciones mayores de esperma con el fin de prevenir la poliespermia. A pesar de que la limitación de esperma puede generar una disminución en la tasa de fecundación, el exceso de espermatozoides tampoco es recomendable, y es necesario un ensayo preliminar para seleccionar la concentración óptima que permita obtener embriones normales y en grandes cantidades.

A. dufresnii es una especie que tiene una amplia distribución, presente tanto en el Océano Atlántico Sur como en el Océano Pacífico (Brogger *et al.*, 2013). Su distribución y batimetría indica que las larvas y adultos habitan aguas con una variabilidad muy grande de temperatura, salinidad, disponibilidad de alimento y otros factores externos. Por lo tanto, es muy probable que la especie presente estrategias para que sus larvas y embriones puedan desarrollarse en estas condiciones. Los huevos de *A. dufresnii* tienen un tamaño pequeño, sin embargo, presentan altos contenidos de lípidos, en especial lípidos de reserva energética (Díaz de Vivar, com. personal), esta característica podría permitirle

sobrevivir aún con poco alimento. La coloración de los huevos indica la presencia de altas concentraciones de pigmentos carotenoides y echinonas que podrían protegerlos de la radiación solar mientras se encuentran en la columna de agua. Si bien existen pocos estudios que evalúan los factores de dispersión de las larvas de erizos de mar, la supervivencia y el tiempo de permanencia en la columna de agua son de los más importantes (Metaxas, 2013).

Tanto el periodo de desarrollo embrionario como el larval encontrado en *A. dufresnii* no difieren demasiado de otras especies del género. La rápida eclosión del huevo permite el desarrollo de una larva que puede alimentarse rápidamente e incrementar sus posibilidades de sobrevivir. Se ha descrito que la tasa de crecimiento larval se encuentra afectada por distintos factores abióticos como la temperatura, salinidad, pH, radiación solar, entre otros, siendo la disponibilidad de alimento una de las más importantes (Metaxas, 2013). En este trabajo se mantuvieron condiciones similares a las encontradas en el ambiente en el mes de febrero, por lo tanto, se espera que en la naturaleza se produzca un desarrollo similar. Las larvas se alimentan de diferentes especies fitoplánctónicas (Strathmann, 1971) que son atrapadas y

dirigidas hacia la zona oral de la misma mediante el uso de los cilios presentes a lo largo de su perímetro (Hart, 1991). Durante el verano es frecuente la presencia de floraciones de fitoplancton en el Golfo Nuevo (Pastor y Bala, 1995). Es posible que este evento provea alimentación a las larvas e incremente su probabilidad de supervivencia. El largo de brazos de las larvas se relaciona con la disponibilidad de alimento en el ambiente (Fenaux *et al.*, 1994), y a pesar de que es muy difícil determinar la cantidad de alimento disponible en el ambiente natural, se sabe que en situaciones de enriquecimiento la metamorfosis se acelera y los brazos son más cortos (Paulay *et al.*, 1985; Fenaux *et al.*, 1994). En este trabajo, los tiempos de desarrollo no difieren de los encontrados en la bibliografía para este género, sin embargo, aún no se conoce si son los mismos que en la zona de muestreo. Para esto sería necesario realizar muestreos de zooplancton regulares para monitorear el desarrollo en condiciones naturales. Kino (2010) realizó un trabajo con estas características en la Isla de Chiloé en Chile y encontró que en comparación con la cantidad de larvas de 2 y 4 brazos halladas, la proporción de larvas de *A. dufresnii* que lograban pasar al estadio de 8 brazos era muy pequeño y aún

menor era el porcentaje de larvas competentes. Estos resultados indican que la tasa de supervivencia fue muy baja en esta población o existe una dispersión alta de estas larvas hacia otros sitios. Los factores asociados con esta dispersión aún se desconocen, sin embargo, se considera que los frentes costeros, los remolinos y otros factores marinos afectan esta dispersión (Metaxas, 2013).

El conocimiento sobre las larvas de *A. dufresnii* aún es limitado y a la fecha no existía una descripción detallada de su desarrollo. Esperamos que este trabajo pueda ser utilizado como base para futuras investigaciones relacionadas con los estadios larvales de esta especie.

CONCLUSION

Se describió detalladamente el desarrollo embrionario y larval de *Arbacia dufresnii*, y se observaron características similares a las descritas para otras especies del mismo género. A partir de la experimentación realizada, se determinó una concentración de gametas que permite lograr una fecundación eficiente para esta especie en condiciones de laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el contexto de la Beca Doctoral de la Lic. Jimena Pía

Fernández y fue financiada por el Subsidio de CONICET PIP 0352/14.

BIBLIOGRAFIA

- Bernasconi I (1942) Primeros estados larvales de *Arbacia dufresnei* (Blv.). *Physis*, 19(53): 305-317.
- Bernasconi, I. 1966. Los equinoideos y asteroideos colectados por el buque oceanográfico R/V Vema, frente a las costas argentinas, uruguayas y sur de Chile. *Rev. Mus. Argent. Cienc. Nat Bernardino Rivadavia.*, 9: 147-75.
- Brogger, M. 2005. Biología reproductiva del erizo verde *Arbacia dufresnii* (Blainville, 1825) en costas del Golfo Nuevo, Patagonia. Tesis de Licenciatura. Universidad de Buenos Aires. 32 pp.
- Brogger, M.I., Martínez, M.I. y Penchaszadeh, P.E. 2010. Reproduction of the sea urchin *Arbacia dufresnii* (Echinoidea: Arbaciidae) from Golfo Nuevo, Argentina. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 90: 1405–1409.
- Brogger, M., Gil, D.G., Rubilar, T., Martínez, M., Díaz de Vivar, M.E., Escolar, M., Epherra, L., Pérez, A.F. y Tablado, A. 2013. Echinoderms from Argentina: Biodiversity, distribution and current state of knowledge. En: J.J. Alvarado y F.A. Solís Marin (eds). *Latin American Echinoderms*. Springer, Berlin: 359–402.
- Castro, K.L. 2014. Dieta del erizo verde de mar *Arbacia dufresnii* y su relación con el alga invasora *Undaria pinnatifida* en costas del Golfo San José, Patagonia. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional del Comahue, Bariloche. 57 pp.
- Catarino, A.I., De Ridder, C., González, M., Gallardo, P. y Dubois, P. 2012. Sea urchin *Arbacia dufresnei* (Blainville 1825) larvae

- response to ocean acidification. *Polar Biol.*, **35**: 455-461.
- Epherra, L., Gil, D.G., Rubilar, T., Perez-Gallo, S., Reartes, M.B. y Tolosano, J.A. 2015. Temporal and spatial differences in the reproductive biology of the sea urchin *Arbacia dufresnii*. *Mar. Freshwater Res.*, **66**: 329-342.
- Epherra, L. 2016. Evaluación del impacto de invertebrados herbívoros nativos sobre el alga invasora *Undaria pinnatifida*: *Arbacia dufresnii* (Echinodermata: Echinoidea) como modelo de estudio. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Mar del Plata. 198 pp.
- Epherra, L., Martelli, A., Morsan, E.M. y Rubilar, T. 2017. Parámetros poblacionales del erizo de mar *Arbacia dufresnii* (Arbacioida, Arbaciidae) en golfos norpatagónicos invadidos por el alga *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Alariaceae). *Rev. Biol. Trop.*, **65**: 101-112.
- Fenaux, L., Strathmann, M.F. y Strathmann, R.R. 1994. Five tests of food-limited growth of larvae in coastal waters by comparisons of rates of development and form of echinoplutei. *Limnol. Oceanogr.*, **39**: 84-98.
- Foltz, K.R., Adams, N.L. y Runft, L.L. 2004. Echinoderm eggs and embryos: procurement and culture. *Methods Cell Biol.*, **74**: 39-74.
- Gianguzza, P. y Bonaviri, C. 2013. *Arbacia*. En J.M. Lawrence (ed.) *Sea urchins: Biology and Ecology*. Elsevier Academic Press, San Diego: 275-283.
- Gilbert, S.F. 2005. *Biología del Desarrollo*. Editorial Médica Panamericana S.A., Buenos Aires, 902 pp.
- Giudice, G. (1986). *The sea urchin embryo. A developmental biological system*. Springer Verlag, Berlin, 249 pp.
- Hart, M.W. 1991. Particle captures and the method of suspension feeding by echinoderm larvae. *Biol. Bull.*, **180**: 12-27.
- Harvey, E.B. 1956. *The American Arbacia and other sea urchins*. Princeton University Press, New Jersey, 298 pp.
- Hinman, V.F. y Burke, R.D. 2018. Embryonic neurogenesis in echinoderms. *WIREs Dev Biol.*, **7**:e316.
- Kino, S. 2010. Reproduction and early life history of sea urchins, *Arbacia dufresnei* and *Pseudechinus magellanicus*, in Chiloe Island and Reloncavi sound, Chile. *Aquac. Sci.*, **58**:65-73.
- Larrain, A., Mutschke, E., Riveros, A. y Solar, E. 1999. Preliminary report on Echinoidea and Asteroidea (Echinodermata) of the Joint Chilean-German-Italian Magellan "Victor Hensen" Campaign, 17 October - 25 November 1991. *Sci. Mar.*, **63**: 433-438.
- Lessios, H.A., Lockhart, S., Collin, R., Sotil, G., Sanchez-Jerez, P., Zigler, K., Pérez, A.F, Garrido, M., Geyer, L. y Bernardi, G. 2012. Phylogeography and binding evolution in *Arbacia*, a sea urchin genus with an unusual distribution. *Mol. Ecol.*, **21**: 130-144.
- Levitan, D.R., Sewell, M.A. y Chia, F.S. 1991. Kinetics of fertilization in the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*: interaction of gamete dilution, age, and contact time. *Biol. Bull.*, **181**: 371-378.
- Metaxas, A. 2013. Larval ecology of echinoids. En J.M. Lawrence (ed.) *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. Elsevier Academic Press, San Diego: 69-81.
- Metchnikoff, E. 1893. *Lectures on the comparative pathology of inflammation*. Kegan Paul, Trench, Truener & Co. LTD, London, 144-147.
- Newcombe, E.M., Cárdenas, C.A. y Geange S. 2012. Green sea urchins structure invertebrate and macroalgal communities in the Magellan Strait, southern Chile. *Aquatic Biol.*, **15**: 135-144.

- Pastor, C.T y Bala, L.O. 1995. Estudios de base en la bahía de Puerto Madryn (Golfo Nuevo, Chubut): parámetros químicos. *Nat. Patagon.*, **3**: 41-56.
- Parra, M., Rubilar, T., Latorre, M., Epherra, L., Gil, D.G. y Díaz de Vivar, M.E. 2015. Nutrient allocation in the gonads of the sea urchin *Arbacia dufresnii* in different stages of gonadal development. *Invertebr. Repr. Dev.*, **59**: 26–36.
- Paulay, G., Boring, L. y Strathmann, R.R. 1985. Food limited growth and development of larvae: experiments with natural sea water. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **93**: 1-10.
- Pearse, J.S. y Cameron, R.A. 1991. Echinodermata: Echinoidea. En A.C. Giese, J.S. Pearse y B.V. Pearse (eds.). Reproduction of marine invertebrates. The Boxwood Press, Pacific Grove, California: 513-662.
- Penchaszadeh, P. y Lawrence, J.M. 1999. *Arbacia dufresnii* (Echinodermata: Echinoidea): A carnivore in Argentinian waters. En M.D. Candia Carnevali y F. Bonasoro (eds.). Echinoderm Research. A.A. Balkema, Rotterdam: 525-530.
- Pennington, J.T. (1985). The ecology of fertilization of echinoid eggs: the consequences of sperm dilution, adult aggregation, and synchronous spawning. *Biol. Bull.*, **169**: 417-430.
- Pérez, A.F., Gil, D.G., y Rubilar, T. 2015. Los equinodermos. En D.J. Calcagno (ed.), Los invertebrados marinos. Vazquez Mazzini, Buenos Aires: 295-316.
- Pisoni, J.P., Dellatorre, F.G y Rivas, A.L. 2017. Temperatura del mar en la estación oceanográfica muelle Luis Piedra Buena durante el periodo 2011-2016. Informe Técnico. 12 pp.
- Rubilar, T., Epherra, L., Deias-Spreng, J., Díaz de Vivar, M.E., Avaro, M., Lawrence, A.L., y Lawrence, J.M. 2016. Ingestion, absorption and assimilation efficiencies, and production in the sea urchin *Arbacia dufresnii* fed a formulated feed. *J. Shellfish Res.*, **35**: 1083–1093.
- Rubilar, T. y Crespi-Abril, A. (2017). Does Echinoderm research deserve an ethical consideration? *Rev. Biol. Trop.*, **65**: 11-22.
- Strathmann, R.R. 1971. The feeding behavior of planktotrophic echinoderm larvae: mechanisms, regulation, and rates of suspensionfeeding. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **6**: 109-160.
- Strathmann, R.R. 1987. Echinoderm larval ecology viewed from the egg. *Echinoderm Stud.*, **2**: 55.
- Teso, S.V., Bigatti, G., Casas, G.N, Piriz, M.L. y Penchaszadeh, P.E. 2009. Do native grazers from Patagonia, Argentina, consume the invasive kelp *Undaria pinnatifida*. *Rev. Mus. Argent. Cienc. Nat Bernardino Rivadavia.*, **11**: 7–14.
- Unuma, T., Sakai, Y., Agatsuma, Y. y Kayaba, T. 2015. Sea urchin aquaculture in Japan. En N.P. Brown y S.D. Eddy (eds.). Echinoderm Aquaculture. Wiley Blackwell, New Jersey: 75-126.
- Vásquez, J., Castilla, J.C. y Santelices, B.. 1984. Distributional patterns and diets of four species of sea urchins in giants kelp forest (*Macrocystis pyrifera*) of Puerto Toro, Navarino Islands, Chile. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **19**: 55-63.
- Williams, D.H.C. y Anderson, D.T. 1975. The reproductive system, embryonic development, larval development and metamorphosis of the sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* (Val.) (Echinoidea:Echinometridae). *Aust. J. Zool.*, **23**: 371–403.
- Zaixso, H.E. y Lizarralde, Z.I. 2000. Distribución de equinodermos en el golfo San José y sur del golfo San Matías (Chubut, Argentina). *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, **35**: 127–145.

Zárate, E., Díaz de Vivar, M.E., Avaro, M.,
Epherra, L., y Sewell, M. 2016. Sex and
reproductive cycle affect lipid and fatty acid

profiles of gonads of *Arbacia dufresnii*
(Echinodermata: Echinoidea). *Mar. Ecol. Prog.
Ser.*, **551**: 185–199.

Evaluación de la efectividad de manejo en las áreas protegidas costero marinas de la provincia del Chubut, Argentina.

Evaluation of effectiveness of handling in the marine coastal protected areas of the province of Chubut, Argentina.

Ricardo R. Fondacaro^{1*}, Ricardo Delfino Shenke², Guillermo Caille^{1,2}, Ana E. Ruiz¹.

1) Facultad de Cs. Naturales y Cs. de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia SJB.

2) Fundación Patagonia Natural.

*ricardofonda@yahoo.com.ar

RESUMEN

Se ha evaluado la efectividad de manejo en ocho Áreas Protegidas Costero Marinas de la Provincia del Chubut, Argentina, basando el estudio en la aplicación de la metodología METT (“Herramienta de Seguimiento de Efectividad de Manejo de Áreas Protegidas”). Esta metodología fue desarrollada por el Banco Mundial y World Wildlife Fund para medir y mejorar la gestión de las áreas protegidas y ha sido adoptada por la Comisión Mundial para Áreas Protegidas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. Para su aplicación, se realizó un trabajo en coordinación con la autoridad de aplicación, la Secretaría de Turismo y Áreas Protegidas de la Provincia, en el marco de talleres participativos conformados con técnicos responsables de las Áreas Protegidas (guardas ambientales y funcionarios provinciales). La aplicación de esta herramienta permitió recabar información acerca de la situación de las Áreas Protegidas Costero Marinas de la Provincia, así como de los logros y necesidades de estos espacios. Esta información permite concluir que el estado de gestión es Alto, no obstante, existen deficiencias que requieren ser atendidas para mejorar la efectividad del manejo de dichas áreas. Por último, se sugieren posibles medidas para mejorar y avanzar en la sustentabilidad de estas áreas protegidas y de las actividades económicas a las que ellas dan soporte.

PALABRAS CLAVES: Efectividad de manejo, Áreas protegidas, Zona costera, Patagonia, Argentina.

ABSTRACT

The management effectiveness has been evaluated in eight Coastal Marine Protected Areas of the Province of Chubut, Argentina, basing the study on the application of the “Management Effectiveness Tracking Tool” (METT) methodology. This methodology was developed by the World Bank and World Wildlife Fund to measure and improve the management of protected areas and has been adopted by the World Commission for Protected Areas of the International Union for the Conservation of Nature. For its application, work was carried out in coordination with the application authority, the Secretariat of Tourism and Protected Areas of the Province, within the framework of participatory workshops formed with technicians responsible for Protected Areas (environmental guards and provincial officials). The application of this tool allowed gathering information about the current situation of the Coastal Marine Protected Areas of the Province, as well as the achievements and needs of these spaces. This information allows us to conclude that the management status is High, however, there are deficiencies that need to be addressed to improve the effectiveness of the management of these areas. Finally, suggestions are proposed to improve and advance in the sustainability of the protected areas and the economic activities to which they gave support.

KEY WORDS: Management effectiveness, Coastal marine protected areas, Patagonia, Argentina.

INTRODUCCION

En la provincia del Chubut, entre los años 1980 y 2010, hubo un incremento poblacional de 93,5%, concentrado principalmente en los principales centros urbanos de la franja costero-marina (INDEC, 2019). Este incremento ha generado una fuerte presión antrópica sobre los recursos naturales y en especial, sobre la biodiversidad. Este crecimiento implicó, por ejemplo, un aumento de los residuos sólidos urbanos,

de los efluentes, del tráfico marítimo y del transporte de hidrocarburos, de la extracción de áridos, de la cinegética, de la pesca y de la captura incidental de juveniles y/o de especies acompañantes de las especies blanco de las pesquerías. Por otro lado, también, con el incremento de la población se introdujeron especies exóticas de origen vegetal y animal, aumentaron las actividades de recreación y se produjo una mayor presión inmobiliaria sobre la zona costera. Se

sumó a ello un importante incremento del turismo, tanto de visitantes nacionales como extranjeros. Actualmente, este escenario continúa y, además, se ha intensificado, ya que persiste el crecimiento poblacional de la región (FCMPyAI, 2008; TCNCC, 2015).

Particularmente, el turismo provincial representa la cuarta actividad económica en importancia dentro del Producto Bruto Geográfico (DGEyC Chubut, 2018). Esta actividad se sustenta en las condiciones naturales de sus costas, donde se destaca la biodiversidad, con la presencia de una fauna carismática y característica del lugar (ballenas francas, elefantes marinos, lobos marinos, pingüinos, cormoranes, entre otras) (Tagliorette *et al.* 2008)

Es trascendente para la región que estos importantes recursos vivos, sobre los que, además, se basa la actividad turística, sean conservados. La implementación de Áreas Protegidas (AP) es la principal herramienta utilizada en la región para la conservación de la biodiversidad. Las Áreas Protegidas Costero Marinas (APCM) de la Provincia del Chubut alcanzan una extensión de 703.303 ha, lo que corresponde al 47% del total de las APCM de Argentina (Delfino Schenke *et*

al. 2012; Caille y Delfino Schenke, 2014).

El cuidado y gestión de estas áreas es responsabilidad de la Secretaría de Turismo y Áreas Protegidas de la Provincia del Chubut. Revisar las condiciones en las que se encuentran y la efectividad de su gestión representa una contribución relevante a su preservación y sostenimiento en el tiempo. Por lo antes expuesto, en el presente estudio se proponen los siguientes objetivos: a) Evaluar la efectividad de manejo de las Áreas Protegidas Costero Marinas (APCM) de la Provincia del Chubut; b) Realizar una evaluación, monitoreo y seguimiento de la efectividad de la gestión de estas áreas; c) Analizar por ítems y por grupo de elementos los resultados obtenidos de la aplicación de la herramienta METT; d) Identificar fortalezas y debilidades acerca de la naturaleza de las amenazas; y e) Proponer propuestas superadoras en los casos donde se observen amenazas.

MATERIALES Y METODO

Se estudiaron ocho APCM de la Provincia del Chubut, que de norte a sur son: Península Valdés (PV), Punta Buenos Aires (PBA), Punta Loma (PLo), Punta León (Pl), Punta Tombo (PT), Cabo Dos Bahías (C2B), Parque

Interjurisdiccional Marino Costero Patagonia Austral (PIMCPA) y Punta del Marqués (PM) (Figura 1).

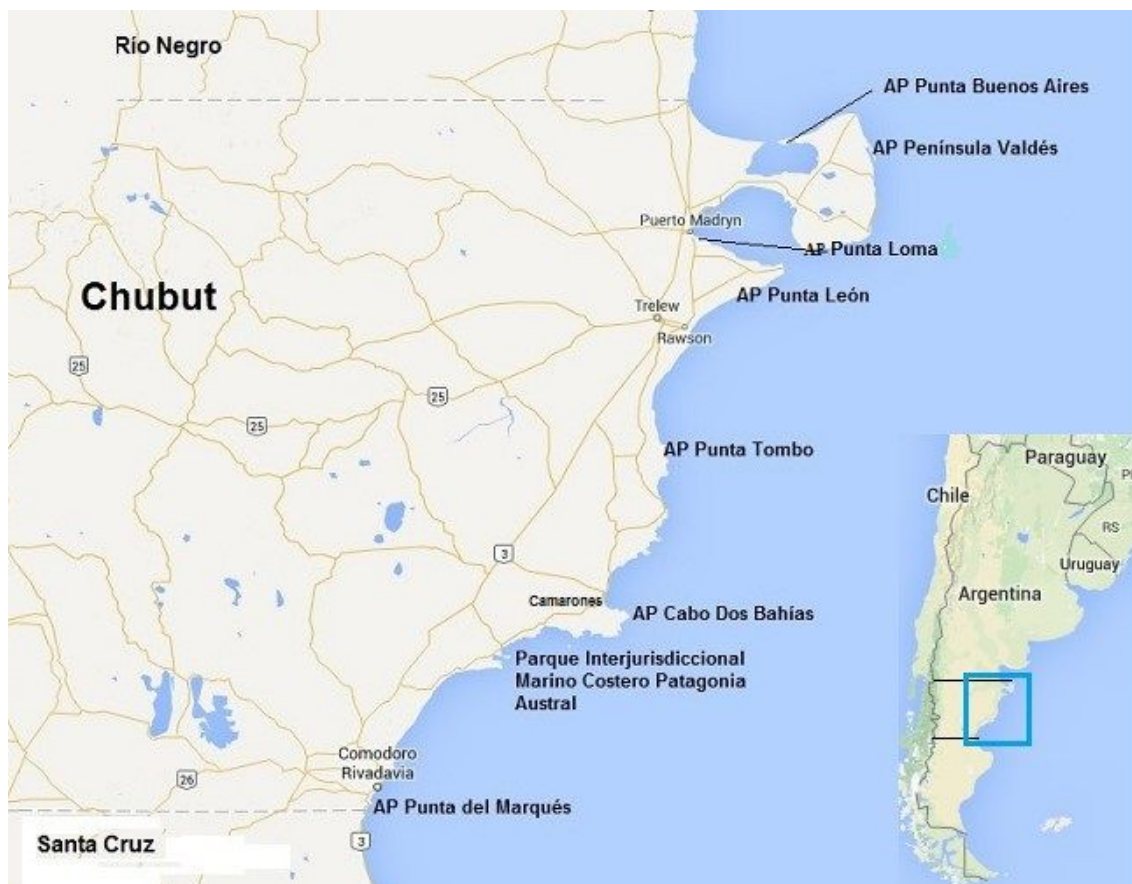


Figura 1. Áreas Protegidas Costero Marinas en la Provincia del Chubut. (Google Maps.2015).
Figure 1. Coastal Marine Protected Areas in the Province of Chubut. (Google Maps.2015).

La metodología de evaluación está basada en la aplicación de la Herramienta de Seguimiento de Efectividad de Manejo de Áreas Protegidas (METT, por sus siglas en inglés) (Stolton *et al.* 2003; Stolton *et al.* 2007), adoptada por la Comisión Mundial para Áreas Protegidas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (WCPA-IUCN).

La sección principal de la evaluación, además de los datos básicos del área protegida, encontrados en el formulario individual, se desarrolla en el formulario con las amenazas en el área (para ambos formularios ver Stolton *et al.* 2007). Este último formulario proporciona una lista genérica de amenazas que las AP enfrentan o pueden enfrentar. En esta hoja de datos se les pide a los evaluadores que identifiquen las

amenazas (existentes/actuales o futuras), y clasifiquen su impacto en el AP. Esta tarea se llevó a cabo en forma consensuada con los expertos de la Fundación Patagonia Natural (FPN).

El formulario con las amenazas para cada una de las APCM no se presenta en este trabajo porque exceden la extensión de la publicación, pero pueden solicitarse a los autores.

Las amenazas se clasifican:

- Alta importancia (3): son aquellas que impactan seriamente y degradan los valores del área.
- Media (2): amenazas que tienen cierto impacto negativo.
- Baja (1): amenazas que están presentes, pero no impactan seriamente los valores del área.
- N/A (0): la amenaza no está presente o no es aplicable en el área.

Por otra parte, está el formulario de evaluación, que consta de 30 preguntas de la herramienta METT. Las mismas están distribuidas en cinco ámbitos definidos por la Comisión Mundial para las Áreas Protegidas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (WCPA-IUCN) (Hocking *et al.* 2000): cinco del ámbito de Contexto, cuatro del ámbito de Planificación, cuatro del ámbito de Insumos, diez referidas a Procesos y cinco sobre

Productos. Dos preguntas (14 y 30) mezclan más de un ámbito (es decir, se puede repetir su análisis o, como en este trabajo, se las considera en uno solo de los ámbitos que las contiene), según Contexto: Preguntas 1, 2, 3, 6 y 9; Planificación: Preguntas 4, 5, 7, 8 y 30; Insumos: Preguntas 10, 12, 14, 15 y 16; Procesos: Preguntas 11, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 25; y Productos: Preguntas 8, 24, 26, 27, 28 y 29.

La escala de puntuación asignada a cada pregunta (atributo) de la encuesta va de 0 a 3. El significado de la puntuación asignado por los referentes a cada atributo evaluado es: 0 si el atributo no está presente; 1 si el atributo está presente, pero hay deficiencias mayores o importantes; 2 si el atributo está presente y presenta deficiencias menores; y 3 si el atributo está presente en toda su expresión posible.

A partir de la puntuación asignada a cada pregunta, se estima el valor relativo en porcentaje (%) alcanzado por cada una de las preguntas en todas las APCM, considerando que se logra el 100% cuando cada una de las ocho APCM obtiene un puntaje de 3. También se estimó el porcentaje que alcanza cada APCM por ámbito (100%, es igual a 3 por el número de preguntas de cada ámbito).

Se considera que estas estimaciones alcanzan una “efectividad de manejo”, o estado de gestión Alto de 75 a 100%, Medio de 50 a 75%, Bajo de 25 a 50% y N/A (no tiene gestión).

A continuación, se desarrolla en cada APCM la totalidad de las preguntas conforme al estado del atributo, ordenadas por ámbito, señalando si está en su máxima expresión, o si las mismas poseen deficiencias menores, deficiencias mayores o el atributo no está presente.

Por otra parte, se amplía la información con el Asunto que trata cada pregunta, el concepto que mereció en la encuesta y acerca de la dificultad para producir el cambio que haría mejorar la gestión del AP. Para finalizar el análisis individual de cada AP, se aplica la tabla respectiva con las amenazas señaladas. (Por razones

de extensión sólo se describe una síntesis). Los cuestionarios se hicieron en los meses de junio y julio del año 2014, coordinados con las autoridades de aplicación, en talleres participativos que contaron con la concurrencia de técnicos del área y de las personas responsables de las áreas naturales protegidas (guardas ambientales). Se completaron las hojas de datos de cada una de las APCM de la provincia.

Cuando se sugieren acciones para modificar el estado en que se encuentra cada atributo en cada una de las APCM, primero se analiza el grado de dificultad que presenta el atributo (Bajo, Medio, Alto) y luego se realiza una propuesta con recomendaciones de acciones y metas para superar esas dificultades.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Formulario de Evaluación

En la Tabla 1 se puede observar que las APCM en Chubut alcanzan en conjunto una puntuación total de 522, sobre un

máximo de 720. Es decir que, si este valor es el 100%, las APCM cubren un 72,5% de los atributos que se consideran en el METT.

Tabla I. Puntuación asignada a cada APCM para las treinta preguntas de la Herramienta de Seguimiento de Manejo (METT) de las APCMs de Chubut.

Table 1. Score assigned to each APCM for the thirty questions of the Management Monitoring Tool (METT) of the Chubut APCMs.

	PV	PBA	PLo	PLe	PT	C2B	PIMC	PM	Σ
1. Estatus Legales	3	3	3	3	3	3	3	3	24
2. Reglamentos para el AP	2	2	3	1	3	1	3	3	18
3. Aplicación de las leyes.	2	2	3	1	3	1	3	3	18
4. Objetivos del AP	3	3	3	2	3	2	3	3	22
5. Diseño del Á Protegida	3	3	3	2	2	3	3	2	21
6. Demarcación de límites	2	3	2	2	2	2	1	2	16
7. Plan de manejo	3	1	1	0	3	1	1	1	11
8. Plan de Trabajo	2	3	2	2	2	2	3	2	18
9. Inventario de Recursos	3	3	2	2	3	2	3	2	20
10. Investigación	3	3	3	3	3	3	3	2	23
11. Manejo de Recursos	3	3	3	2	3	3	3	3	23
12. Cantidad de personal	2	2	2	1	3	2	3	3	18
13. Man. de Rec. Humanos	2	3	2	1	3	2	2	3	18
14. Capacitación	2	3	2	0	2	2	2	2	15
15. Presupuesto Actual	2	3	2	1	2	2	2	2	16
16. Estabilidad presupuestaria	3	3	2	2	3	2	2	2	19
17. Manejo financiero	2	3	2	2	3	2	2	2	18
18. Equipos	2	3	2	0	3	2	2	2	16
19. Mantenim. de equipo	2	3	2	0	2	2	2	2	15
20. Prog.de Educ, y concientiz.	3	1	1	0	3	1	1	1	11
21. Rel. Com. Gub. Colindantes	3	2	2	2	3	0	0	0	12
22. Pueblos indígenas	3	1	2	1	2	2	2	1	14
23. Comunidades Locales	3	2	2	1	2	2	2	2	16
24. Infraest, para Visitantes	3	2	2	0	3	2	2	2	16
25. Operarios de Turismo	3	3	3	0	3	1	2	2	17
26. Cuotas	3	3	3	0	3	1	0	3	16
27. Evaluación de Condiciones	3	3	3	2	3	0	0		14
28. Evaluación de Acceso	3	3	2	0	3	2	2	3	18
29. Eval. beneficio económico	3	3	3	1	3	2	3	2	20
30. Monitoreo y Evaluación	2	2	3	1	3	2	3	3	19
Sumatoria (Σ)	78	77	70	35	82	54	63	63	522
Porcentaje (%)	87	86	78	39	91	60	70	70	72,5

También, se observa que el APCM con mayor puntuación es Punta Tombo con el 91%, seguida por Península Valdés (87%), Punta Buenos Aires (86%), Punta

Loma (78%), Cabo Dos Bahías y Parque Interjurisdiccional Marino Costero Patagonia Austral (70%) y Punta León presenta la puntuación menor (60%).

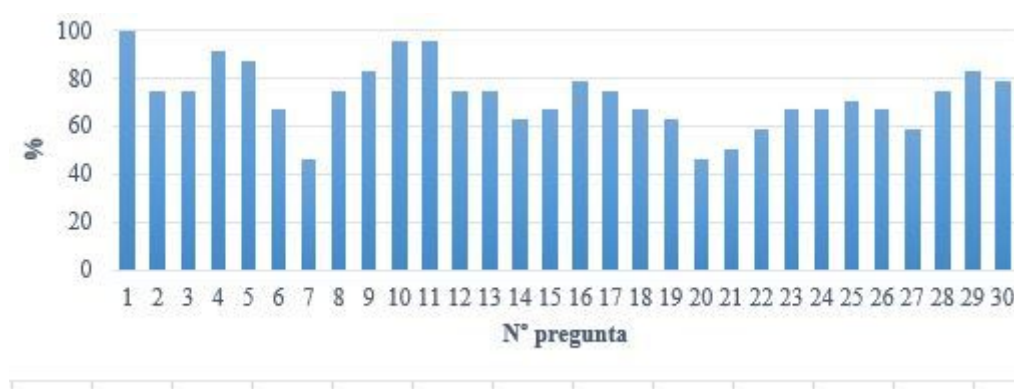


Figura 2. Puntuación relativa (%) que alcanzan las preguntas en todas las APCMs de Chubut.
Figure 2. Relative score (%) reached by the questions in all the APCMs of Chubut.

En la Figura 2 se observa que son 16 preguntas, de un total de 30, que alcanzan o superan el 75% de la puntuación relativa de todas las APCM. Por ejemplo, la pregunta 1, Estatutos Legales, alcanza el valor 100%, lo que significa que la pregunta está desarrollada en su máxima expresión, y que todas las APCM están creadas por Ley. Se observan 12 preguntas entre el 50 y el 75% y 2 preguntas están por debajo del 50%.

Análisis por ámbito de evaluación

Los elementos de evaluación por ámbito (Tabla II) que mayor puntuación alcanzaron están en Contexto (80%). Este ámbito responde a las preguntas relacionadas con la situación actual del área. Le siguen los ámbitos de Planificación, que responde a dónde se quiere llegar; e Insumos, que trata de lo que las áreas necesitan, ambos con un 76%. Luego le sigue el ámbito de Productos (¿qué hicimos?) con un 70%. El menor valor se registró en el ámbito de Procesos (¿cómo lo haremos?) 67%.

Tabla II. Valores medios en porcentaje que alcanza cada ámbito.
Table II. Average values in percentage that each scope reaches.

Ámbito	Contexto	Planificación	Insumos	Procesos	Producto
Valor Promedio (%)	80	76	76	67	70

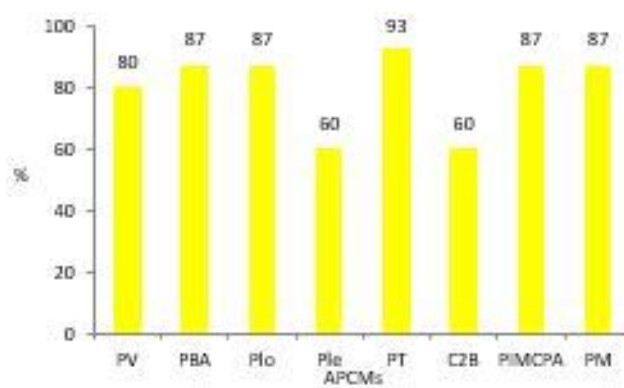


Figura 3. Ambito de Contexto para las APCMs. de Chubut.
Figure 3. Context Scope for the APCMs. of Chubut.

En la Tabla II y la Figura 3 se puede observar que el ámbito de Contexto tiene un promedio para todas las APCMs de 80%. Alcanza su máxima expresión en el

AP Punta Tombo (93%) y la menor puntuación en las AP Punta León y Cabo Dos Bahías (60%).

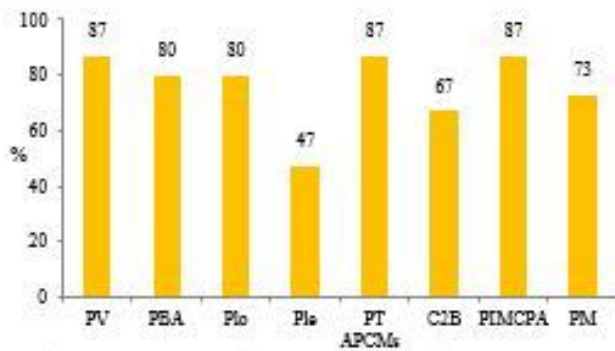


Figura 4. Ambito de Planificación para las APCMs. de Chubut.
Figure 4. Scope of Planning for the APCMs. of Chubut.

En la Tabla II y la Figura 4 se puede observar que el ámbito de Planificación tiene un promedio para todas las APCMs de 76%; alcanza su máxima expresión en las APs de Península de Valdés, Punta

Tombo y Parque Interjurisdiccional Marino Costero Patagonia Austral (87%) y la menor puntuación en el AP de Punta León (47%).

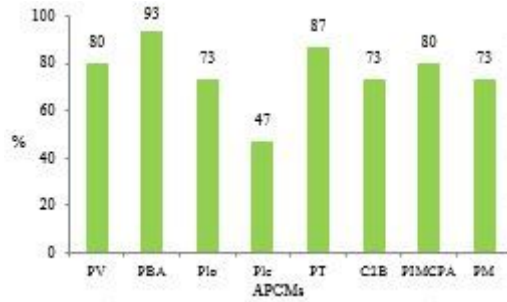


Figura 5. Ambito de Insumos para las APCMs de Chubut.
Figure 5. Scope of Inputs for the APCMs. of Chubut.

En la Tabla II y la Figura 5 se puede observar que el ámbito de Insumos tiene un promedio para todas las APCMs de 76%; alcanza su máxima expresión en el

AP Punta Buenos Aires (93%) y la menor puntuación en el AP Punta León (47%).

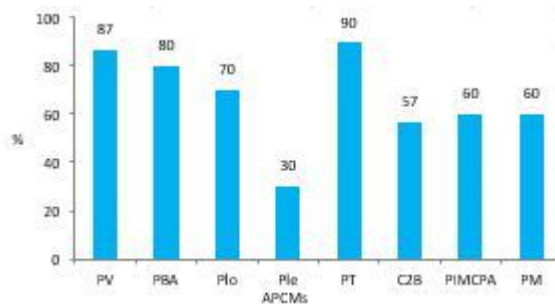


Figura 6. Ambito de Procesos para las APCMs. de Chubut.
Figure 6. Scope of Processes for the APCMs. of Chubut.

En la Tabla II y la Figura 6 se puede observar que el ámbito de Procesos tiene un promedio para todas las APCMs de

67%; alcanza su máxima expresión en el AP Punta Tombo (90%) y la menor en el AP Punta León (30%).

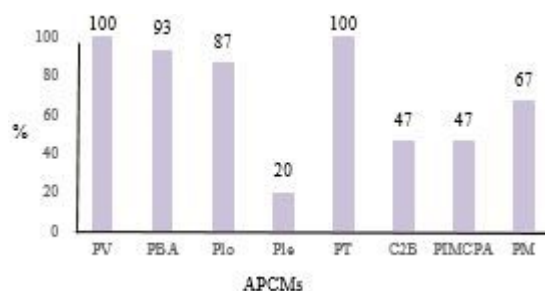


Figura 7. Ambito de Productos para las APcMs. de Chubut.

Figure 7. Scope of Products for the APcMs. of Chubut.

En la Tabla II y la Figura 7 se puede observar que el ámbito de Productos tiene un promedio para todas las APcMs de 70%; alcanza su máxima expresión en las APs Península Valdés y Punta Tombo (100%) y la menor puntuación en el AP Punta León (20%).

Análisis de la puntuación obtenida para cada una de las APcMs

El APcM Península Valdés (Tablas I y III) tiene un promedio de 86,8% de puntaje general, estando todos los

ámbitos por encima de 80%. Ello señala que el estado de gestión es ALTO. Sobre el total de preguntas tiene 18 con el atributo en la máxima expresión. Las restantes preguntas señalan que el atributo está presente con deficiencias menores. Las amenazas indican que las mayores están en las actividades relacionadas con el turismo, con la actividad pesquera y con la introducción de especies no nativas o invasoras. Las deficiencias son menores y la dificultad para superarlas es baja o media.

Tabla III. Escala de puntuación de las preguntas ordenadas por ámbito en el AP Península Valdés.

Table III. Score scale of the questions ordered by scope in the Península Valdés AP.

Ámbito	Promedio 86,8%	Máxima expresión	Deficiencias Menores	Deficiencias mayores	No está presente
Contexto	80	1, 9	2, 3, 6		
Planificación	87	4,5,7	8;30		
Insumos	80	10; 16	12; 14; 15		
Procesos	87	11; 20; 21; 22; 23; 25	13; 17; 18; 19		
Productos	100	24; 26; 27; 28; 29			

Tabla IV. Escala de puntuación de las preguntas ordenadas por ámbito en el AP Punta Buenos Aires.
Table IV. Score scale of the questions ordered by scope in the Punta Buenos Aires AP.

Ámbito	Promedio 86,6%	Máxima expresión	Deficiencias menores	Deficiencias mayores	No está presente
Contexto	87	1; 6; 9	2; 3		
Planificación	80	4; 5; 7	8	7	
Insumos	93	10; 15; 16; 14	12		
Procesos	80	11; 13; 17; 18; 25	21; 23	20; 22	
Productos	93	26; 27 ;28; 29	24		

El APCM Punta Buenos Aires (Tablas I y IV) tiene un promedio de 86,6% de puntaje general, estando todos los ámbitos por encima de 80%, es decir, el estado de gestión es ALTO. Sobre el total de preguntas tiene 19 con el atributo en la máxima expresión. Siete preguntas señalan que el atributo está presente con deficiencias menores y tres preguntas tienen el atributo presente con deficiencias mayores.

Las dificultades para superarlas son bajas o medias. Se señala como amenaza mayor la introducción de plantas no nativas o exóticas. Está en relación con las amenazas que tiene el AP Península Valdés en su totalidad por la introducción de algas exóticas trasladadas en los cascos de los barcos pesqueros que faenan en otros mares.

Tabla V. Escala de puntuación de las preguntas ordenadas por ámbito en el AP Punta Loma.
Table V. Score scale of the questions ordered by scope in the Punta Loma AP.

Ámbito	Promedio 79,4%	Máxima Expresión	Deficiencias menores	Deficiencias mayores	No está presente
Contexto	87	1; 2; 3	6; 9		
Planificación	80	4; 5; 30	8	7	
Insumos	73	10	12; 15; 16; 14		
Procesos	70	11; 25	13; 17; 18; 19; 21; 22; 23	20	
Productos	87	26; 27; 29	24; 28		

El APCM Punta Loma (Tablas I y V) tiene un promedio de 78% de puntaje general, lo que señala un estado de gestión ALTO. Los ámbitos que superan el 75% son Contexto, Planificación y Productos, estando por debajo de este valor los ámbitos de Insumos y Procesos. Sobre el total de preguntas tiene 12 con el atributo en la máxima expresión; 16

preguntas señalan que el atributo está presente con deficiencias menores y dos tienen el atributo presente con deficiencias mayores. Se reconoce dificultad Baja o Media para generar cambios en esta AP. La amenaza mayor está relacionada con las actividades del turismo.

Tabla VI. Escala de puntuación de las preguntas ordenadas por ámbito en el AP Punta León.
Table VI. Score scale of the questions ordered by scope in the Punta Leon AP.

Ámbito	Promedio 40,8 %	Máxima Expresión	Deficiencias menores	Deficiencias mayores	No está presente
Contexto	60	1	6; 9	2; 3	
Planificación	47		4; 5; 8	30	7
Insumos	47	10	16	12; 15	14
Procesos	30		11; 17; 21	13; 22; 23	18; 19; 25
Productos	20		27	29	24;26;28

El APCM Punta León (Tabla I y VI) tiene un promedio de 39% de puntaje general, que como es el puntaje más bajo de las APs, indica que su estado de gestión es BAJO. Sobre el total preguntas tiene dos con el atributo en la máxima expresión. Diez preguntas señalan que el atributo está presente con deficiencias menores, nueve poseen el atributo presente con deficiencias mayores y ocho indican que el atributo

no está presente. Existen dificultades Altas para generar cambios en el AP de Punta León, también se observa que la proporción de dificultades Medias supera a las dificultades Bajas. Ello está relacionado principalmente con la no existencia de un plan de manejo, la falta de un presupuesto estable y, por lo tanto, los valores (biodiversidad, ecológicos y culturales) están sujetos a degradación parcial.

Tabla VII. Escala de puntuación de las preguntas ordenadas por ámbito en el AP Punta Tombo.
Table VII. Score scale of the questions ordered by scope in the Punta Tombo AP.

Ámbito	Promedio 91,4%	Máxima Expresión	Deficiencias menores	Deficiencias mayores	No está presente
Contexto	93	1; 2; 3; 9	6		
Planificación	87	4; 30	5; 8	7	
Insumos	87	10; 12; 16	15; 14		
Procesos	90	11; 13; 17; 18; 20; 21; 25	19; 22; 23		
Productos	100	24; 26; 27; 28; 29			

El APCM Punta Tombo (Tabla I y VII) tiene un promedio de 91% de puntaje general, siendo el puntaje más alto de las ANP analizados, es decir, estado de gestión ALTO. Todos los ámbitos están por encima del 75%, incluso el ámbito de Productos alcanza el 100%. Sobre el total de preguntas tiene 21 con el atributo en la máxima expresión. Ocho preguntas señalan que el atributo está presente con

deficiencias menores y una tiene el atributo presente con deficiencias mayores. Se identifica dificultad Baja o Media para generar los cambios. Las amenazas mayores en el AP están relacionadas con la afluencia de turistas que la visitan, con las construcciones y con los vehículos utilizados en dicha actividad.

Tabla VIII. Escala de puntuación de las preguntas ordenadas por ámbito en el AP Cabo Dos Bahías.
Table VIII. Score scale of the questions ordered by scope in the Cabo Dos Bahías AP.

Ámbito	Promedio 60,8%	Máxima expresión	Deficiencias menores	Deficiencias mayores	No está presente
Contexto	60	1	6; 9	2; 3	
Planificación	67	5	4; 8; 30	7	
Insumos	73	10	12; 15; 16; 14		
Procesos	57	11	13; 17; 18; 19 22; 23	20; 25	21
Productos	47		24; 28; 29	26	27

El APCM Cabo Dos Bahías (Tablas I y VIII) tiene un promedio de 60% de puntaje general, señalando un estado de gestión MEDIO. Ninguno de los ámbitos alcanza el valor de 75%. Sobre el total preguntas tiene cuatro con el atributo en la máxima expresión; 18 preguntas señalan que el atributo está presente con deficiencias menores, seis tienen el atributo presente con deficiencias mayores y dos indican que el atributo no

está presente. Se observa que las dificultades para superar las deficiencias son equivalentes entre Bajas y Medias, y tiene dificultad Alta cuando el atributo no está presente, relacionado con la existencia de un plan de manejo que aún no está implementado y que el presupuesto actual es aceptable, pero podría mejorarse para lograr el manejo efectivo.

Tabla IX. Escala de puntuación de las preguntas ordenadas por ámbito en el AP Parque Inter-jurisdiccional Marino Costero Patagonia Austral.

Table IX. Score scale of the questions ordered by scope in Parque Inter-jurisdiccional Marino Costero Patagonia Austral.

Ámbito	Promedio 72,5%	Máxima expresión	Deficiencias menores	Deficiencias mayores	No está presente
Contexto	87	1; 2; 3; 9		6	
Planificación	87	4; 5; 8 ;30		7	
Insumos	80	10; 12	15; 16; 14		
Procesos	60	11	13;17;18;19; 22;23; 25	20	21
Productos	47	29	24; 28		26; 27

El APCM Parque Interjurisdiccional Marino Costero Patagonia Austral (Tablas I y IX) tiene un promedio de 70% de puntaje general, estado de gestión MEDIO. Los ámbitos que superan el 75% son Contexto, Planificación e Insumos, estando por debajo de este valor los ámbitos de Procesos y Productos. Sobre el total de preguntas tiene 12 con el atributo en la

máxima expresión; 12 preguntas señalan que el atributo está presente con deficiencias menores, tres poseen el atributo presente con deficiencias mayores y en tres el atributo no está presente. Esta AP tiene un estado de gestión MEDIO, dificultades para superar las deficiencias Bajas y Medias en cantidades equivalentes, y dificultad Alta, igual que en las APCMs Punta

León y Cabo Dos Bahías. Ello se relaciona con el Plan de Manejo que aún no está siendo implementado y el Presupuesto que podría mejorarse para lograr el manejo efectivo. Las amenazas señalan las Intrusiones Humanas y es el

APCM donde se marcan posibles Amenazas Culturales y Sociales Específicas. Ocupa una amplia franja marina que es caladero pesquero y la mayor amenaza se relaciona con esa actividad.

Tabla X. Escala de puntuación de las preguntas ordenadas por ámbito en el AP Punta del Marqués. Score scale of the questions ordered by scope in Punta del Marqués AP.

Ámbito	Promedio 72%	Máxima expresión	Deficiencias menores	Deficiencias mayores	No está presente
Contexto	87	1; 2; 3	6; 9		
Planificación	73	4; 30	5; 8	7	
Insumos	73	12	10; 15; 16; 14		
Procesos	60	11; 13	17; 18; 19; 23; 25	20; 22	21
Productos	67	26; 28	24; 29		27

El APCM Punta del Marqués (Tablas I y X) tiene un promedio de 70% de puntaje general, señalando un estado de gestión MEDIO. Un solo ámbito supera el 75% en el área de Contexto, estando por debajo de este valor los ámbitos de Planificación, Insumos, Procesos y Productos. Sobre el total preguntas tiene 10 con el atributo en la máxima expresión; 15 preguntas señalan que el atributo está presente con deficiencias menores, tres tienen el atributo presente con deficiencias mayores y en dos el atributo no está presente. Las dificultades están relaciona con el Plan de Manejo y el Presupuesto. A los comentarios

realizados para el AP PIMCPA, se suman otras amenazas producto de la cercanía con el mayor centro poblado de la Patagonia, la ciudad de Comodoro Rivadavia y la villa balnearia de Rada Tilly.

De acuerdo con los resultados, luego de aplicar la Herramienta de Seguimiento de Manejo de Áreas Protegidas o METT, las APCMs en la Provincia del Chubut alcanzan valores de efectividad de manejo promedio del 72,5%, con rango entre 60 y 91%. Esta puntuación estaría indicando la existencia de una efectividad de manejo promedio, cercano al valor ALTO. Esta puntuación

ubica al proceso de manejo de las APCMs de la Provincia del Chubut por encima del alcanzado en las otras provincias argentinas con litoral marítimo (Delfino Schenke R. *et al.* 2012).

CONCLUSIONES

La experiencia de aplicación de la herramienta METT resultó ser práctica, su elaboración insumió relativamente poco tiempo y brindó en forma ordenada una evaluación del estado de gestión de las APCMs en la Provincia del Chubut.

El estudio realizado señala que esta herramienta cumple con los requisitos de ser relativamente rápida y sencilla para ser implementada por el personal de las áreas protegidas. De esta manera, no dependerá de niveles altos de financiamiento ni de otros recursos. Tiene por ello la ventaja de poder ser replicada a intervalos interanuales, y de esta forma observar la evolución del estado de gestión en forma comparativa entre APCM y sus tendencias en el tiempo.

No obstante, se debe considerar dos elementos para tener en cuenta en la evaluación:

a) Las preguntas tienen diferente importancia cuando el objetivo es buscar la sustentabilidad de los espacios

naturales. Es así como en este trabajo se optó por tratar con mayor énfasis las preguntas que abarcan plan de manejo, presupuesto, existencia de personal permanente y capacitado para cumplir con los objetivos.

b) Las respuestas que se obtienen del personal técnico del área y de las personas responsables de las áreas protegidas (guardas ambientales) están provistas de cierta subjetividad, producto de los diferentes orígenes, capacitaciones y experiencias. Es por ello, que previo a los encuentros donde se responden las preguntas, es necesario trabajar con estos actores para aunar criterios en el ejercicio de aplicación de la herramienta.

Otro acercamiento al estudio de la efectividad de manejo de las APCMs provinciales, no obstante alcanzar en promedio un valor cercano a Alto, se encuentra en los elementos conceptuales “ámbito”, que aportan conocimiento sobre las fortalezas y debilidades que presenta la gestión de las APCMs. El “ámbito” que alcanza mayor puntuación es el de Contexto, relacionado con la situación actual. Le siguen los ámbitos de Planificación e Insumos, que abarcan las preguntas sobre a dónde se quiere llegar, y de los recursos, respectivamente; y luego el ámbito de

Productos, relacionado principalmente con los programas de manejo. El menor valor se obtuvo en el ámbito de Procesos, que abarca los resultados directos logrados con la implementación de los planes de manejo.

Llevado este análisis a las APCMs en forma individual, es el AP Punta Tombo la que alcanza la mayor puntuación, con un estado de gestión ALTO. Le siguen las APCMs Península Valdés, Punta Buenos Aires y Punta Loma, que también tienen un estado de gestión ALTO. Por su parte, las APCMs de Cabo Dos Bahías, Parque Interjurisdiccional Marino Costero Patagonia Austral y Punta del Marqués tienen estado de gestión MEDIO. Punta León es el APCM que tiene la menor puntuación; y por lo tanto presenta mayores deficiencias de manejo, con un estado de gestión BAJO.

En cuanto a las dificultades que presentan las APCMs para salvar las

deficiencias en su manejo y relacionadas con las amenazas, se encuentra una coincidencia que tiene que ver principalmente con la existencia o no de un Plan de Manejo, con contar o no con un presupuesto estable, que repercute en las condiciones de los valores importantes del área (de biodiversidad, ecológicos y culturales) que quedan expuestos a una posible degradación severa.

En el análisis de cada una de las APCMs, además de señalar las fortalezas y deficiencias en la gestión, la aplicación de la herramienta METT ha permitido su clasificación a partir del grado de las dificultades para superarlas. En este sentido, además de contabilizar en cuantas APCM se presentan las deficiencias, se realizó, para cada atributo, las propuestas con las acciones y metas recomendadas como prioridades a corto y mediano plazo (Tabla XI).

Tabla XI. Dificultades para generar cambios y acciones y metas recomendadas.
Table XI. Difficulties to generate changes and actions and recommended goals.

Asunto	Dificultad para generar cambios	N° de AP con Dificultades	Acciones/Metas a corto y mediano plazo)
1. Estatutos legal	--	-	-----
2. Reglamentos para el área protegida.	Media	4	Capacitación del personal en los reglamentos de las APs y en los sistemas de procedimientos para su aplicación.
3. Aplicación de las leyes.	Baja	4	Capacitación del personal para implementar las leyes
4. Objetivos del área protegida	Baja	2	Relevar y aclarar los objetivos de cada área. Hacer propuestas
5. Diseño del Área Protegida	Media	3	Analizar distintas opciones de expansión del AP. Realizar talleres participativos con los propietarios de los campos vecinos y analizar alternativas que mejoren el diseño del AP o su zona de amortiguación.
6. Demarcación de los límites	Media	7	Establecer tipo de demarcación más apropiada. Presupuestar
7. Plan de manejo	Media	6	Impulsar la finalización del Plan de Manejo
8. Plan de Trabajo	Baja	7	Capacitación en POAs. Analizar debilidades de los planes de trabajo.
9. Inventario de Recursos	Media	4	Sistematizar la información sobre el AP. Incorporar al POA del AP un programa de monitoreo al menos 4 veces al año (desarrollo del programa, costos cronograma)
10. Investigación	Baja	1	Establecer prioridades de manejo y promover actividades en esa dirección. Contactar y generar acuerdos con el sistema académico.
11. Manejo de Recursos	Media	1	Capacitación para el manejo de recursos
12. Cantidad de personal	Media	5	Incremento de presupuesto para incorporar personal
13. Manejo de Recursos Humanos	Media	5	Implementar cursos de capacitación en manejo de recursos humanos

Asunto	Dificultad para generar cambios	Nº de AP con Dificultades	Acciones/Metas a corto y mediano plazo)
14. Capacitación	Baja	7	Establecer planes de capacitación en APs.
15. Presupuesto Actual	Media	7	Establecer prioridades de manejo y promover actividades en esa dirección con la adecuación presupuestaria correspondiente
16. Estabilidad presupuestaria	Baja	5	Establecer un presupuesto básico que de estabilidad al funcionamiento del APs
17. Manejo financiero	Baja	6	Capacitación en financiamiento de APs.
18. Equipos	Media	6	Establecer brecha entre la infraestructura y equipos actuales y la ideal. Proponer un programa para infraestructura y equipamiento.
19. Mantenimiento de equipo	Baja	7	Establecer brecha de financiamiento para mantenimiento de equipos e infraestructura. Analizar posibilidades de financiamiento
20. Programa de Educación y concientización	Baja	6	Formalizar en el POA un Programa de Educación. Impulsar acuerdos si corresponde (escuelas, universidades, academia)
21. Áreas protegidas y operaciones comerciales gubernamentales colindantes	Baja	6	Impulsar un programa de participación pública, con metas de cooperación.
22. Pueblos indígenas	Media	7	Impulsar un programa de participación pública.

Asunto	Dificultad para generar cambios	N° de AP con Dificultades	Acciones/Metas a corto y mediano plazo)
23. Comunidades Locales	Baja	7	Promover un programa de encuentros participativos
24. Infraestructura para Visitantes	Media	6	Establecer brecha de financiamiento. Analizar posibilidades de financiamiento
25. Operarios de Turismo	Baja	4	Promover un programa proactivo con los operarios de turismo
26. Cuotas	Baja	3	Implementar un sistema de colecta de las cuotas.
27. Evaluación de Condiciones	Alta	4	Establecer amenazas a los valores importantes del AP y acciones de remediación, mitigación o compensación
28. Evaluación de Acceso	Media	4	Diseñar y adecuar un sistema de protección conforme a los objetivos de conservación para la Ap.
29. Evaluación de los beneficios económicos	Media	4	Promover investigaciones económicas con estudio de mercado.
30. Monitoreo y Evaluación	Baja	4	Verificación sistemática del cumplimiento de la planificación

Finalmente, y a partir de los buenos resultados obtenidos con la aplicación participativa de la herramienta METT para contribuir a la sustentabilidad de las APCMs de la Provincia del Chubut, se recomienda la replicación de este análisis con periodicidad ajustada a los tiempos de ejecución propios de los programas de manejo de cada área.

AGRADECIMIENTOS

A las autoridades y técnicos de la Secretaría de Turismo y Áreas Protegidas de la Provincia del Chubut; a los guardias ambientales (guarda faunas) de las APCM provinciales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Caille G. & Delfino Schenke R. 2014. Las áreas protegidas costero – marinas

de Argentina: efectividad de manejo y tendencias. *El Bohío boletín electrónico*, 4(6):22-32.

https://www.academia.edu/33075352/Las_%C3%A1reas_protegidas_costero_marinas_de_Argentina_efectividad_de_manejo_y_tendencias

Delfino Schenke R., Musmeci J. M. & G. Caille. 2012. Sistema Inter jurisdiccional de áreas protegidas costero marinas: efectividad de manejo y línea de base para conformar el sistema. Fundación Patagonia Natural. *Revista Parques*, 2, 10 pp.

https://www.academia.edu/33075356/Sistema_Inter_Jurisdiccional_de_%C3%81reas_Protegidas_Costero_Marinas_SIAPCM_Argentina_Proyecto_ARG_10_G47_GEF_PNU

DGEyC Chubut. Anuarios Estadísticos 2014, 2015, 2016 y 2017. Dirección General de Estadísticas y Censos de la Provincia del Chubut (DGEyC Chubut), Argentina.

http://www.estadistica.chubut.gov.ar/home/index.php?option=com_content&view=article&id=589&Itemid=549

FCMPyAI 2008. Síntesis del estado de conservación del Mar Patagónico y áreas de influencia. Foro para la Conservación del Mar Patagónico y Áreas de Influencia (FCMPyAI). Claudio

Campagna, (ed) (ISBN 978-987-24414-3-2), 336 pp.

Google maps.

<https://www.google.com.ar/maps/@-40.8371786,-42.7305638,4z> Editado.

Hocking M., Stolton S. & N. Dudley. 2000. Evaluating Effectiveness: A Framework for Assessing the Management of Protected Areas. IUCN, Gland, Suiza y Cambridge, UK. x + 121pp.

INDEC. 2019. Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 1991, 2001 y 2010; Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, Argentina. https://www.indec.gov.ar/nivel3_default.asp?id_tema_1=2&id_tema_2=41

Stolton S., Hockings M., Dudley N., MacKinnon K. & T. Whitten. 2003. Como informar sobre los avances en el manejo de áreas protegidas individuales. WWF-WB, 17pp.

Stolton S, Hockings M, Dudley N, MacKinnon K, Whitten T & Leverington F. 2007. Management Effectiveness Tracking Tool. Reporting Progress at Protected Area Sites: Second Edition. WWF International, 22pp.

Tagliorette A., Guarino V., Janeiro C., Losano P. & G. Caille. 2008. Relevamientos de usos turísticos y recreativos en la zona costera patagónica. Serie Informes Técnicos

PMIZCP2, FPN, Argentina, (ISBN 978-987-24414-1-8;

DOI: 10.13140/RG.2.1.2858.3128), 5, 65 p. + CD-ROM.

TCNCC. 2015. Informe País de Argentina sobre la Tercera Comunicación Nacional sobre Cambio Climático (TCNCC) a la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. Dirección Nacional de Cambio Climático, MAyDS de la Nación, Argentina, 264 pp. <http://unfccc.int/resource/docs/natc/argnc3s.pdf>

Arribazón de *Anotrichium furcellatum* (J. Agardh) Baldock (Ceramiales, Rhodophyta) en Bahía Engaño-Chubut-Argentina.

Drift marine algae of *Anotrichium furcellatum* (J. Agardh) Baldock (Ceramiales, Rhodophyta) in Bahia Engaño-Chubut-Argentina.

Laura B. Pérez^{1*}; Susana Perales¹; Norma H. Santinelli² & Rodrigo Mansilla¹

¹Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud. Comodoro Rivadavia. Chubut. Argentina.

²Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud. Instituto de Investigación de Hidrobiología. Trelew. Chubut. Argentina.

*perezlulib@yahoo.com.ar

RESUMEN

Es importante dar a conocer a la población de zonas costeras la composición específica de las algas marinas bentónicas componentes de arribazones. Describir fenómenos naturales de estas características permite conocer la composición de las comunidades submareales cercanas, el posible impacto ecológico que provocan en el área de ocurrencia y determinar sus posibles usos y aplicaciones en diversos campos del conocimiento. En este trabajo se describe un evento registrado en Bahía Engaño-Chubut-Argentina durante el verano de 2017 y 2018. La mayor proporción de los especímenes analizados presentes en el arribazón corresponde a *Anotrichium furcellatum* (J. Agardh) Baldock (Rhodophyta).

PALABRAS CLAVES: algas marinas, *Anotrichium furcellatum*, arribazón, Patagonia,

SUMMARY

It is important to make known to the population of coastal areas the specific composition of large arrivals of drift marine algae. Describing natural phenomena of these characteristics allows us to know the composition of nearby subtidal communities, the possible ecological impact, they cause in the area of occurrence and determine their possible uses and applications in various fields of knowledge. This work describes an event registered in Bahia Engaño-Chubut-

Argentina during the summer of 2017 and 2018. The highest proportion of the specimens analyzed in this event corresponds to *Anotrichium furcellatum* (J. Agardh) Baldock (Rhodophyta).

KEY WORDS: *Anotrichium furcellatum*, drift marine algae, Patagonia.

INTRODUCCIÓN

Los arribazones algales consisten en la llegada a las playas o a las riberas de lagunas costeras y estuarios, de grandes cantidades de macroalgas *sensu lato*, es decir, pertenecientes a cualquiera de los phyla Chlorophyta, Ochrophyta o Rhodophyta. Según la localización geográfica y la estacionalidad de las especies algales involucradas, éstas serán mono o poliespecíficas. Portillo Hahnefeld, 2008; Dreckmann & Senties, 2013; Berglund *et al.* 2003 y Borja, 1987 estudiaron el comportamiento y composición de los arribazones en distintas playas. Por lo general, el sector turístico los ha venido calificando como basura playera durante los últimos 30 años (Dreckmann & Senties, 2013). Los procesos de putrefacción asociados a la descomposición de estas grandes cantidades de material biológico que arriban a las playas pueden afectar a las condiciones del uso recreativo de la zona, así como causar un mal aspecto y olores desagradables (Portillo Hahnefeld, 2008). La causa de los arribazones generalmente se asocia a

tormentas o corrientes oceánicas que generan desprendimientos masivos en las comunidades bentónicas de los fondos cercanos (Kirkman & Kendrick, 1997). Estos eventos son conocidos en distintas costas del mundo, mostrando mayor magnitud en las zonas donde se desarrollan grandes praderas submarinas de algas y fanerógamas (Borja, 1987).

Algo más al norte de la localidad de estudio, en Bahía Nueva, Golfo Nuevo, se produce anualmente una considerable biomasa de macroalgas que el mar deposita sobre las playas de Puerto Madryn permaneciendo flotando y posteriormente descomponiéndose. Durante los meses de verano, la Municipalidad local recolecta alrededor de 8.000 toneladas de algas de arribazón para permitir las actividades recreativas estivales en la playa. En Puerto Madryn, los arribazones han sido un fenómeno común, generalmente asociado con vientos fuertes, principalmente de dirección norte y noreste, o *mar de fondo*. En los relevamientos florísticos realizados entre 1992 y 1996 se identificó a *Ulva* como el género más

representativo en los arribazones, por lo cual en esa época se especulaba con una progresiva evolución de las praderas de macroalgas hacia el fenómeno de "marea verde", relacionado con un incremento en el aporte de nutrientes provenientes de los efluentes vertidos a Bahía Nueva (Piriz *et al.*, 2003). En 1992, la introducción accidental en Golfo Nuevo de *Undaria pinnatifida* y su posterior adaptación a las condiciones ambientales de esta localidad, posibilitó el progresivo aumento de su densidad poblacional (Casas & Piriz, 1996). A partir de 1996 se hace evidente un cambio en la composición florística estival de los arribazones en términos de biomasa seca, apareciendo *U. pinnatifida* como dominante y *Codium vermilara* como codominante (Piriz *et al.*, 2003; Eyras & Sar, 2003).

En las últimas décadas (1990-2007) las condiciones ambientales en las localidades del norte del golfo San Jorge pueden haber cambiado por eventos registrados para la zona como aluviones de agua dulce, mareas negras por derrames de petróleo, introducción de *Undaria pinnatifida* desde 2002 y marcada proliferación de *Anotrichium furcellatum* (Zaixso, *et al.* 2015).

El género *Anotrichium* (Nägeli) pertenece a la tribu Griffithsiae de la

familia Ceramiaceae (Ceramiales, Rhodophyta), (Guiry, 2018). Entre el 19 y el 26 de febrero del año 2000 en la costa de la Provincia de Buenos Aires, (37° 41' S; 38° 18' W) se observó una arribazón masiva de algas constituida principalmente por *Anotrichium furcellatum*. El material de arribazón proveniente de las playas de Mar del Plata fue prácticamente unialgal (Boraso de Zaixso & Akselman, 2005). *Anotrichium furcellatum* fué observada en los Golfos San José y Nuevo en intermareal y submareal (Boraso de Zaixso *et al.*, 1999; Díaz *et al.*, 2002 y Boraso de Zaixso & Akselman, 2005). La Composición florística de arribazones en playas del sudeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina fue caracterizada en Quequén (febrero de 2012) por *Dictyota spp.* y *A. furcellatum*; en Necochea (febrero de 2012) por *Dictyota spp.*, *Jania rubens* y *Coralina officinalis*; y en Mar del Plata (Marzo de 2013) por Gigartinaceae no identificada, *Rhodymenia sp.*, *Ahnfeltiopsis sp.* y *C. officinalis* (Becherucci & Benavides, 2016).

El objetivo de este trabajo fue identificar la composición florística de las especies que componen dos arribazones de algas ocurridos en el verano de 2017 y 2018 en Bahía Engaño, Chubut, Argentina, y

contribuir al conocimiento de las poblaciones sub mareales locales.

MATERIAL Y MÉTODOS

La zona del estudio se localizó en la Bahía Engaño sobre la costa Atlántica en donde desemboca el río Chubut, formando un estuario (43° 18' S; 65° 06' W). Allí se ubica la villa balnearia de Playa Unión al norte del río y lindante con el Puerto de Rawson. A su vez Playa Magagna, se ubica al sur del río y completa las poblaciones que se encuentran sobre ambas márgenes de la desembocadura (Figura 1).

El aporte de agua dulce a la Bahía Engaño se realiza, principalmente, a través del río Chubut. Este atraviesa importantes ciudades del valle como Gaiman, Trelew y Rawson y aporta a la Bahía elementos nutritivos y contaminantes que son susceptibles de alterar el ecosistema. El caudal medio de este río es de 47 m³/seg. y alimenta el embalse Florentino Ameghino que tiene una superficie de 71 km² (Instituto Provincial del Agua, 2018). Entre los distintos aportes que pueden afectar su

calidad, se pueden identificar entre otros, el sistema cloacal de Rawson, el drenaje de los sistemas de irrigación, el puerto de Rawson por la actividad normal del puerto, de los buques de la flota amarilla por la selección y limpieza de las capturas de peces que no se pudieron realizar en el mar (Esteves *et al.*, 1997).

Las muestras de los arribazones ocurridos en el verano del año 2017 y 2018 fueron recolectadas en Bahía Engaño, Chubut, conservadas en formol neutro al 5% y teñido con azul de anilina. Los ejemplares fueron identificados a nivel de especie, género o familia dependiendo del estado de conservación o de si se hallaban fértiles o estériles.

Los ejemplares del material identificados se depositaron en el Herbario Regional. Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud; U.N.P.S.J.B. HRP. INDEX. HERBARIORUM. Para la clasificación de las macroalgas se utilizó la base de datos de Algae Base, *Guiry & Guiry* (2018).

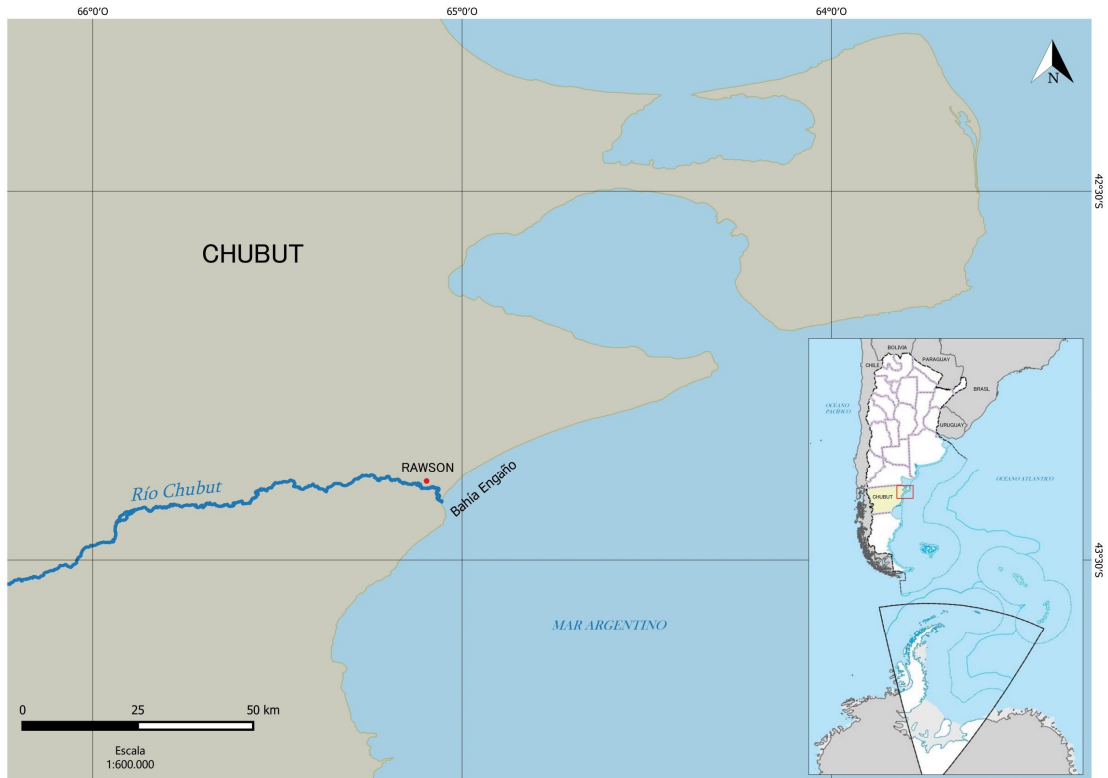


Figura 1. Ubicación general del área de estudio: Bahía Engaño, Chubut.
Figure 1. General location of the study area: Bahía Engaño, Chubut.

RESULTADOS

Los arribazones cubrieron una gran superficie costera en Bahía Engaño – Chubut- Argentina (Figura 2 A, B, C, D). La zona correspondiente a Playa Unión y la zona de Pesca, ubicada más al norte de Playa Unión comprendió una superficie aproximada de 12 km. La zona correspondiente a Playa Magagna, comprendió una superficie aproximada de 5 km. Se identificó la especie *Anotrichium furcellatum* (J. Agardh) Baldock) como principal componente del arribazón que cubrió las playas de Bahía Engaño en la Provincia del Chubut, Argentina. Sólo se encontraron talos vegetativos filamentosos, no

observándose estructuras reproductivas como tetrasporofitos con esporangios. Los talos son filamentosos, delicados, corticados, de color rosado-rojizo, están ramificados lateralmente en los ápices y se muestran pseudodicotómicos en el resto del talo; alcanzan hasta 14 cm de longitud y se encuentran usualmente en grupos numerosos en los que las ramas de diferentes talos individuales se encuentran enredadas entre sí (Figura 3).

En verano del año 2017 el arribazón fue monoespecífico constituido un 100% por *Anotrichium furcellatum* mientras que, en verano de 2018 se observó un 99 % de *A. furcellatum* y el

porcentaje restante correspondió a otros géneros de algas rojas: *Aphanocladia robusta* (Figura 4a), *Hymenena laciniata* (Figura 4b), *Ballia sertularioides* (Figura 4c), *Rhabdonia coccinea* (Figura 4d), *Ceramium spp.*, *Antithamnionella ternifolia*, *Heterosiphonia berkeleyi*, *Phycodrys*

quercifolia, *Medeiothamnion flaccidum*, *Griffithsia antártica*, *Streblocladia camptoclada*, y algas pardas: *Sphacelaria sp.*, *Halopteris sp.* (Figura 4e), *Myrionema macrocarpum* y *Dictyota dichotoma*. La clasificación de las algas pardas y rojas encontradas se presenta en la Tabla I.



Figura 2. Arribazón en Bahía Engaño (Chubut), zona costera cubierta de un tapiz de algas rojas. A y B: Playa Unión C y D: Playa Magagna.

Figure 2. Drift marine algae in Bahía Engaño (Chubut): coastal area covered with a carpet of red algae. A y B: Playa Unión C y D: Playa Magagna.

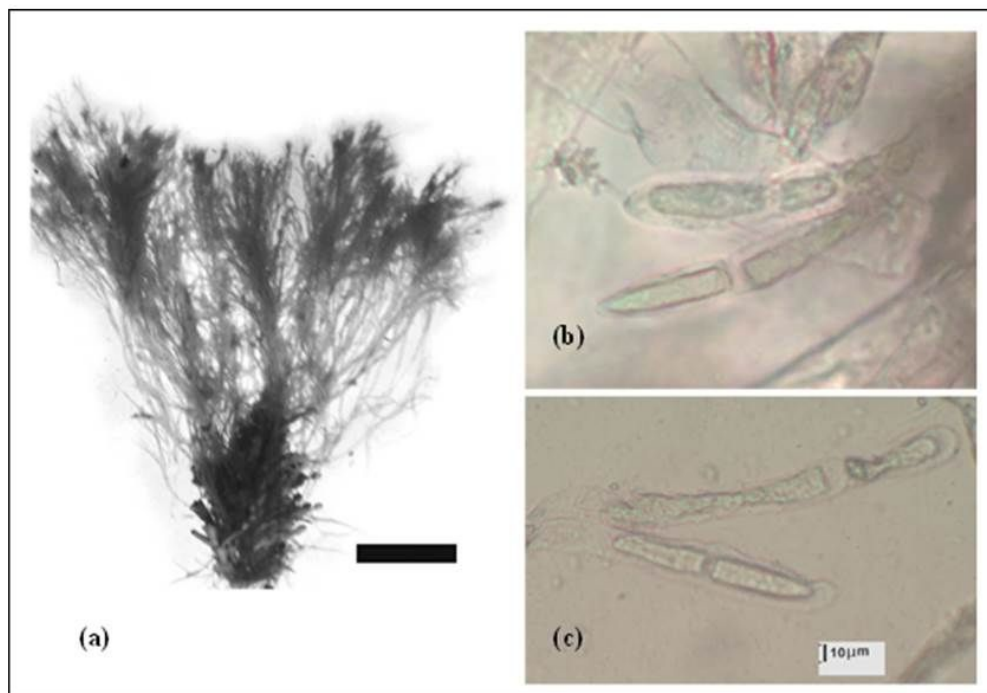


Figura 3. *Anotrichum furcellatum*, (a) aspecto general. La barra indica: 2 cm; (b) y (c): detalle del talo vegetativo filamentosos, ramificado lateralmente en los ápices.

Figure 3. *Anotrichum furcellatum*, overall appearance. The bar indicates: 2 cm; (b) y (c): detail of the filamentous vegetative talus, branched laterally at the apices.

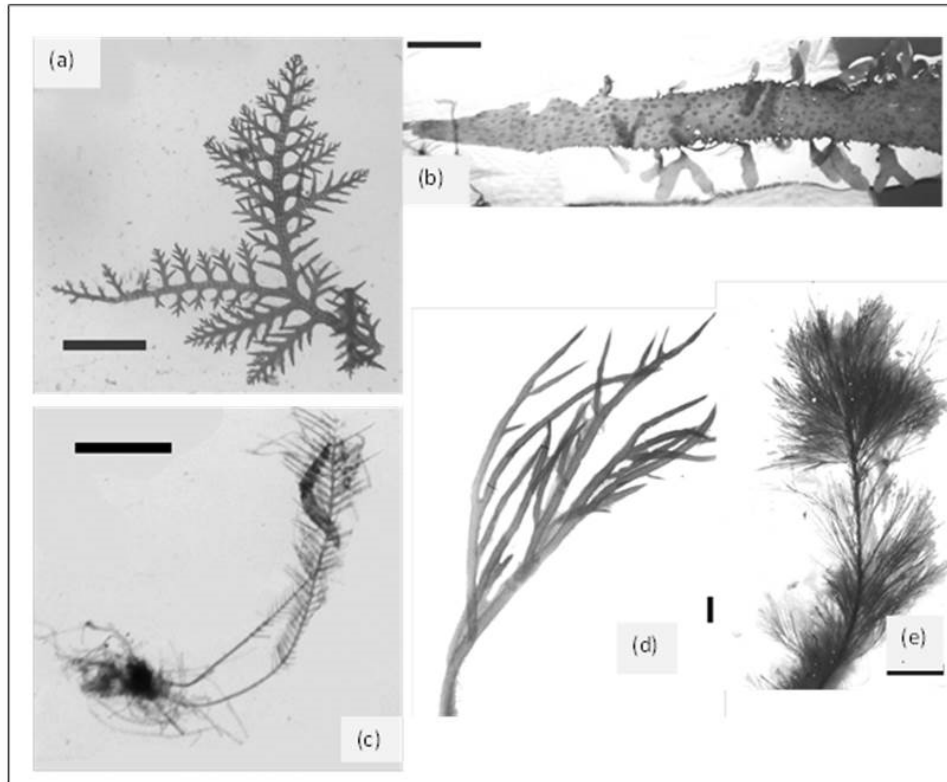


Figura 4. Composición florística del arribazón observado en Bahía Engaño – Chubut durante el verano de 2018: (a) *Aphanocladia robusta*. (La barra indica: 1 mm); (b) *Hymenena laciniata*. (La barra indica: 1 cm); (c) *Ballia sertularioides*. (La barra indica: 0,5 mm). (d) *Rhabdonia coccinea*. (La barra indica: 10 μ m); (e) *Halopteris sp.* (La barra indica: 1 cm).

Figure 4. Floristic composition seaweeds washed ashore has been observed at Bahía Engaño – Chubut During the summer of 2018 (a) *Aphanocladia robusta*. (The bar indicates: 1 mm); (b) *Hymenena laciniata*. (The bar indicates: 1 cm); (c): *Ballia sertularioides*. (The bar indicates: 0,5 mm); (d) *Rhabdonia coccinea*. (The bar indicates: 10 μ m); (e) *Halopteris sp.* (The bar indicates: 1 cm).

Tabla I: Composición florística de los arribazones de algas marinas en playas de Bahía Engaño-Chubut.
Table I: Floristic composition of drift marine algae in Bahía Engaño beaches, Chubut Argentina.

Phylum	Orden	Familia	Género
Rodophyta	Ceramiales	Ceramiaceae	<i>Ceramium</i> spp. Roth, A.W.
	Ceramiales	Ceramiaceae	<i>Antithamnionella ternifolia</i> (Hooker fil. & Harvey) Lyle
	Ceramiales	Dasyaceae	<i>Heterosiphonia berkeleyi</i> Montagne
	Ceramiales	Delesseriaceae	<i>Phycodrys quercifolia</i> (Bory) Skottsberg
	Ceramiales	Delesseriaceae	<i>Hymenena laciniata</i> (J.D.Hooker & Harvey) Kylin
	Ceramiales	Wrangeliaceae	<i>Anotrichium furcellatum</i> (J. Agardh) Baldock
	Ceramiales	Wrangeliaceae	<i>Medeothamnion flaccidum</i> (J D Hooker & Harvey) J F Brauner
	Ceramiales	Wrangeliaceae	<i>Griffithsia antarctica</i> J D Hooker & Harvey
	Ceramiales	Rhodomelaceae	<i>Streblocladia camptoclada</i> (Montagne) Falkenberg
	Ceramiales	Rhodomelaceae	<i>Aphanocladia robusta</i> Pujals
	Balliales	Balliaceae	<i>Ballia sertularioides</i> (Suhr) Papenfuss
Heterokontophyta	Sphacelariales	Sphacelariaceae	<i>Sphacelaria</i> Lyngbye
	Sphacelariales	Stypocaulaceae	<i>Halopteris</i> Kützing
	Ectocarpales	Ectocarpales	<i>Myrionema macrocarpum</i> Skottsberg
	Dictyotales	Dictyotaceae	<i>Dictyota dichotoma</i> (Hudson) J.V. Lamouroux
	Gigartinales	Areschougiaceae	<i>Rhabdonia coccinea</i> (Harvey) Harvey

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En la actualidad, los arribazones usualmente se utilizan como bioindicadores, donde estudios de la biología marina pueden aportar valoraciones indirectas, tanto cualitativas como cualitativas de la variabilidad biológica existente en las comunidades bentónicas Portillo

Hahnefeld (2008). Por lo que se debería "sensibilizar a la población de los valores ambientales y ecológicos que proporcionan los arribazones en las playas ya que suponen "un beneficio enorme" para el ecosistema del litoral porque aportan materia orgánica y nutrientes a las comunidades vegetales de las profundidades marinas y sirven de

alimento para peces, insectos y aves. Aunque muchos puedan considerarlas como basura orgánica por su aspecto y por su olor, las macroalgas que las mareas dejan en la orilla “son unas grandes desconocidas” y encierran un enorme valor ecológico. Es conveniente dar a conocer la composición específica de estos arribazones a la comunidad, en especial al sector vinculado al turismo para que no sean considerados “basura playera” (Dreckmann & Senties, 2013). *Anotrichium furcellatum* es una especie que puede formar en ocasiones arribazones por una colonización rápida y masiva del submareal (Zaixso & Akselman 2005). La ocurrencia de estos arribazones de algas podría deberse a las condiciones meteorológicas como tormentas y marejadas, mientras que la magnitud de los mismos estaría determinada por la abundancia, en términos de biomasa, de las poblaciones macroalgales presentes en el submareal (Berglund *et al.*, 2003). Boraso de Zaixso & Akselman (2005) indican que *A. furcellatum* se distribuye en el intermareal y submareal del Golfo San José; Díaz *et al.*, 2002 en el Golfo Nuevo; Piriz *et al.*, 2003 y Eyra & Sar, 2003 en Puerto Madryn; en este estudio *A. furcellatum* se encontró abundante en las playas de Bahía Engaño como

principal formadora del arribazón en el verano del año 2017 y 2018.

Es importante continuar estudiando los eventos de arribazones que ocurren en Patagonia y aportar conocimiento encaminado a paliar los impactos sociales y ambientales y promover acciones que se traduzcan en un beneficio social y medioambiental, como lo describe Portillo Hahnefeld (2008) en su estudio sobre arribazones en islas Canarias. Este autor reconoce que las algas y las plantas marinas son “molestas” para los usuarios de la playa, pero suponen “un beneficio enorme” para el ecosistema del litoral porque aportan materia orgánica y nutrientes a las comunidades vegetales de las profundidades marinas y sirven de alimento para peces, insectos y aves.

En cuanto a los beneficios sociales o económicos, el aprovechamiento de este fenómeno natural crea una alternativa de ingresos en áreas carenciadas, no necesita de grandes inversiones y promueve la re-utilización para otros productos de interés, entre otros.

AGRADECIMIENTOS:

Agradecemos a la Doctora Alicia Boraso de Zaixso por su valiosa ayuda en la determinación taxonómica de *Anotrichium furcellatum*, las especies

acompañantes y por la lectura crítica de la publicación.

Fotografías: Playa Magagna Dra María Eva Góngora y Dr Nelson Bovcon.

Recolección de material: Dr Nelson Bovcon.

BIBLIOGRAFIA

- Becherucci, M. E. & Benavides, H. 2016. Composición florística de arribazones de algas marinas en playas del sudeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina, Iheringia. Série Botânica. ISSN ON-LINE 2446-8231; 71(1):1-5. Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul
- Berglund, J., Mattila, J., Rönnerberg, O., Heikkilä, J. & Bonsdorff, E. 2003. Seasonal and inter-annual variation in occurrence and biomass of rooted macrophytes and drift algae in shallow bays. Estuarine, coastal and shelf Science; 56:1167-1175.
- Boraso de Zaixso, A. L., Zaixso, H. E. & G. Casas. 1999. Asociaciones de algas bentónicas submareales en el golfo San José (Chubut, Argentina). Physis (Buenos Aires), Secc. A, 57 (132-133): 17-27.
- Boraso de Zaixso, A. L. & Akselman, R. 2005. *Anotrichium furcellatum* (Ceramiaceae, Rhodophyta) en Argentina. Una posible especie invasora. Boletín Sociedad Argentina de Botánica 40 (3-4): 207-213.
- Borja, A. 1987. Cartografía, evaluación de la biomasa y arribazones del alga *Gelidium sesquipedale* (Clem.) Born et Thur en la costa guipuzcoana (N España). Investigaciones Pesqueras 51(2):199-224.
- Casas, G. N. & M. L. Piriz. 1996. Surveys of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) in Golfo Nuevo, Argentina. Hydrobiologia 326/327: 213-215.
- Díaz, P., López Gappa, J. J. & M. L. Piriz. 2002. Symptoms of Eutrophication in Intertidal Macroalgal Assemblages of Nuevo Gulf (Patagonia).
- Dreckmann, K. M. & Senties, A. 2013. Las arribazones de algas marinas en el Caribe mexicano: evento biológico natural o basura en las playas. CONABIO. Biodiversitas. 107 (marzo-abril 2013), p. 7-11. ISSN: 1870-1760.
- Esteves J. L., Solís M., Gil M, Santinelli N., Sastre V, González Raies C, Hoffmeyer M. & M. Commendatore. 1997. Evaluación de la contaminación urbana de la Bahía Engaño (Provincia del Chubut) Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica. ISSN N° 0328–462X Informe Tecnico, 35. 29 p.
- Eyras, M.C. & Sar, E. A. 2003. Arribazones estivales en Puerto Madryn, Argentina, como materiales para la obtención de compost. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 38 (1-2):105-111.
- Guiry, M. D. & Guiry, G. M. 2018. *Algae Base*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 06 July 2018.
- Instituto provincial del agua, 2018. <http://institutodelagua.chubut.gov.ar/es/13/cuenca-del-rio-chubut>.
- Kirkman, H. & Kendrick, G. A. 1997. Ecological significance and commercial harvesting of drifting and beach-cast macroalgae and seagrasses in Australia: a review. Journal of Applied Phycology 9:311-326.
- Kühnemann, O. 1972 a.
- Piriz, M. L., Eyras, M.C. & Rostagno, C.M. 2003. Changes in biomass and botanical composition of beach-cast seaweeds in a

disturbed coastal area from Argentine Patagonia. *Journal of Applied Phycology* 15: 67-74.

Portillo Hahnefeld, E. 2008. Fuentes mapas meteorológicos y de olas: Surfline.com Edición: I^o Septiembre 2008 Internet: viiww.itccanarias.org Edita: Instituto Tecnológico de Canarias. SA División de Investigación y Desarrollo Tecnológico Departamento de Biotecnología Playa de Pozo Izquierdo, s/n 3511 9 Santa Lucía - Las Palmas

Impresión: Daute Diseño, S. L. ISBN: D. L.: 978-84-691-5105- 1 G C I 183-2008.

Zaixso, H., Boraso de Zaixso, A. L.; Ciancia, M.; Cerezo, A. S; Piriz, M. L.; Casas, G. N. & Eyra M. C. 2015. Utilización de las macroalgas marinas de la costa Argentina y sus hidrocoloides. En el libro *La Zona Costera Patagónica Argentina*. Volumen I. Recursos Biológicos Bentónicos: 3 a 60. Publisher: Editorial Universitaria de la Patagonia. Versión digital.

¿La temperatura y la escala de cultivo son factores determinantes en la composición bioquímica y el perfil de ácidos grasos en microalgas?

Are temperature and culture scale determinant factors in biochemical composition and fatty acid profile in microalgae?

Rojas Quiroga María Laura*^{1,2}, Avaro Marisa³, Gittardi Agustín^{3,5}, Díaz de Vivar María Enriqueta³, Soria Gaspar^{2,4}, Van der Molen Silvina¹

¹Instituto de Biología de Organismos Marinos (IBIOMAR, CCT CONICET-CENPAT), Boulevard Brown 2915, Puerto Madryn, U9120ACD, Chubut, Argentina.

²Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Boulevard Brown 2930, Puerto Madryn, U9120ACQ, Chubut, Argentina

³Laboratorio de Química de Organismos Marinos (LABQUIOM), Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Sede Puerto Madryn, U9120ACQ, Chubut, Argentina

⁴Laboratorio de Oceanografía Biológica (LOBio), Centro para el Estudio de los Sistemas Marinos (CESIMAR, CCT CONICET-CENPAT), Boulevard Brown 2915, Puerto Madryn, U9120ACD, Chubut, Argentina

⁵Facultad Regional Chubut (FRCH). Universidad Tecnológica Nacional (UTN). Sede Puerto Madryn. Av. del Trabajo 1536, Puerto Madryn, U9120QGQ. Argentina.

*E-mail: rojasquiroga@cenpat-conicet.gob.ar

RESUMEN

Se cultivaron tres especies de microlagas -*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros* sp. y *Tetraselmis* sp.- en sistema batch en dos condiciones que combinaron la escala de producción y la temperatura: i) pequeña escala y 24 °C, y ii) escala masiva y temperatura variable. Se determinó la composición bioquímica proximal y el contenido de cenizas y se identificaron y cuantificaron los ácidos grasos para cada combinación de especie-tratamiento por triplicado. Ninguna de las especies presentó diferencias significativas para ninguno de sus componentes (lípidos, carbohidratos, proteínas y cenizas) entre tratamientos. Los ácidos grasos no presentaron diferencias significativas cuando se los analizó agrupándolos por grado de saturación (insaturados, monoinsaturados y poliinsaturados). Los ácidos grasos poliinsaturados agrupados en las familias (n – 3) o (n – 6) y los cocientes -(SFA + MUFA) / PUFA y (n – 3) / (n – 6)- tampoco presentaron diferencias significativas entre tratamientos. Al realizar análisis más profundos de cada ácido graso en particular, con especial énfasis en aquellos considerados esenciales, se

pudo determinar que aunque los tratamientos aplicados no modificaron significativamente la composición bioquímica de las microalgas estudiadas se observaron diferencias que deben ser tenidas en cuenta a la hora de determinar las dietas óptimas para cada especie de bivalvo en cada etapa de su ciclo de vida.

PALABRAS CLAVES: Composición Bioquímica; Composición de Ácidos grasos; Escala; Microalga; Temperatura

ABSTRACT

Isochrysis galbana, *Chaetoceros* sp. and *Tetraselmis* sp. were cultivated in a batch system at two conditions that combine scale production and temperature: i) small scale and 24°C, and ii) massive scale and variable temperature. Proximal composition and ash were determined and fatty acids were identified and quantified for each species-treatment combination for triplicate. None of the three species presented significant differences for each component (lipid, carbohydrate, protein, and ash) between treatments. Fatty acids did not present significant differences in the analysis performed grouping them by degree of saturation (unsaturated, monounsaturated and polyunsaturated). Polyunsaturated fatty acids did not present significant differences between treatments when they are grouped in (n – 3) or (n – 6) families either. Additionally, the two ratios (SFA + MUFA) / PUFA and (n – 3) / (n – 6) did not show significant differences between treatments: The applied treatments did not significantly modify the proximal composition, however, when individual fatty acids were analyzed, with the main emphasis on those that are considered essential, differences can be observed that deserve to be taken into account when determining the optimal diets for each bivalve species in each life stage.

KEY WORDS: Biochemical composition; Fatty acid composition; Microalgae; Scale; Temperature.

INTRODUCCIÓN

En todas las etapas del cultivo de moluscos bivalvos, desde larvas hasta adultos las microalgas son utilizadas como único alimento (Helm y Bourne, 2006). Los requerimientos nutricionales en bivalvos marinos varían a lo largo de su ciclo de vida, es decir que cada estadio

posee requerimientos energéticos específicos. Así es como por ejemplo, durante la formación de la concha y el crecimiento somático, son necesarias mayores cantidades de proteínas formadoras de tejidos (Kreeger *et al.*, 1995, Darriba *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2011). En cambio, a lo largo de la

gametogénesis, cuando los organismos están desarrollando sus gónadas, son necesarias mayores cantidades de lípidos de buena calidad, y en este caso los carbohidratos juegan un rol importante en la biosíntesis de los mismos (Gatenby *et al.*, 2003). En las hembras además puede observarse que tanto el contenido de lípidos como de proteínas se incrementa durante la gametogénesis. Para alcanzar los requerimientos energéticos necesarios en cada etapa de vida estos compuestos deben ser suministrados mediante el alimento ingerido y/o por reservas previamente almacenadas en gónadas u otros tejidos (Saucedo *et al.*, 2002, Darriba *et al.*, 2005).

El éxito de una producción de bivalvos depende de la disponibilidad de cultivos de microalgas apropiados que posean ciertas características. Entre ellas se incluyen: tamaño, calidad nutricional, ausencia de toxinas y tasas de crecimiento adecuadas para la producción en masa (Whyte, 1987, Polanco *et al.*, 2000, Martínez-Fernández y Southgate, 2007).

Dado que la composición bioquímica de las microalgas depende de diversos factores (especie, condiciones de cultivo, etapa de crecimiento, etc.), el conocer dicha composición bioquímica resulta indispensable en el cultivo de bivalvos

en condiciones controladas. Además, es sabido que las dietas multiespecíficas de microalgas son más efectivas que aquellas mono-específicas ya que mejoran el desarrollo de las larvas y aumentan sus tasas de crecimiento, incrementando la producción general de semillas de bivalvos (Helm y Bourne, 2006). Entre las especies de microalgas algunas de las más utilizadas como alimento para los moluscos bivalvos debido a su buena ingestibilidad y digestibilidad son *Isochrysis galbana* (Filo Haptophyta), *Chaetoceros* sp. (Filo Bacillariophyta) y *Tetraselmis* sp. (Filo Chlorophyta) (Hoff y Snell, 1989, Brown, 2002, Helm y Bourne, 2006, da Costa, 2009).

La composición bioquímica de las microalgas cultivadas varía no solo entre especies de microalgas sino también que la calidad nutricional depende de las condiciones de cultivo de las mismas. Si las condiciones de cultivo se encuentran estandarizadas, los cultivos de microalgas con buenos y altos valores nutricionales tendrán valores similares entre distintos cultivos para cada una de las especies en particular (Helm y Bourne, 2006). Los parámetros físico-químicos de un cultivo como la temperatura, el fotoperiodo, el pH, el medio de cultivo utilizado y la salinidad son de gran relevancia en términos de

tasas de crecimiento y calidad bioquímica de las microalgas (Hoff y Snell, 1989, Brown *et al.*, 1993, Brown *et al.*, 1993). Por otra parte, la fase de crecimiento en la que se encuentre el cultivo de microalgas también afecta su composición bioquímica (Whyte *et al.*, 1987, Huerlimann *et al.*, 2010). En organismos cultivados en sistemas tipo batch, la composición bioquímica a menudo varía simultáneamente con la disminución de nutrientes en el medio de cultivo que se produce a lo largo del crecimiento en densidad del cultivo (Morris *et al.*, 1983, Whyte *et al.*, 1987). Generalmente las proteínas disminuyen su cantidad mientras que los lípidos y carbohidratos aumentan cuando los cultivos alcanzan la fase estacionaria de crecimiento (Ogbonna y Tanaka, 1996, Zhu *et al.*, 1997).

Para bivalvos cultivados en condiciones controladas, las microalgas son la principal fuente de micro y macronutrientes (Hoff y Snell, 1989). Es por ello que el conocimiento de la composición bioquímica de las microalgas usadas como alimento de los cultivos *target* resulta esencial a la hora de diseñar las dietas óptimas para cada fase de los mismos (da Costa, 2009). Los carbohidratos y los lípidos son considerados esenciales en las dietas (Enright *et al.*, 1986), y entre los últimos,

en particular los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (Helm *et al.*, 1973, Langdon y Waldock, 1981). Los ácidos grasos poliinsaturados (ácidos grasos que contienen más de una insaturación en su cadena hidrocarbonada) pueden ser divididos en dos “familias” dependiendo de la posición del primer doble enlace más cercano al fin de la cadena hidrocarbonada: $(n - 3)$ y $(n - 6)$. Dado que la mayoría de los bivalvos carecen de la capacidad de sintetizar PUFA de ambas familias a partir de precursores saturados (Gatenby *et al.*, 2003) el nivel de estos componentes es determinado principalmente por la ingesta a través de la dieta. Los bivalvos necesitan altas proporciones de ácidos grasos poliinsaturados, tales como 20:5n-3c (ácido eicosapentanoico, EPA) o 22:6n-3c (ácido docosahexaenoico, DHA), por lo tanto especies de microalgas con alto grado nutricional deben ser incorporadas. En este sentido, las dietas de microalgas que tienen bajas proporciones del cociente $(SFA+MUFA)/PUFA$ y cociente $(n - 3)/(n - 6)$ mayor que 2 son óptimas, por ejemplo en el cultivo de larvas y juveniles de ostras (Mitra *et al.*, 2015). Cuando se realiza el cultivo del ciclo de vida completo de un molusco bivalvo, se requieren distintas cantidades de

alimento para cubrir las diferentes necesidades acordes a cada estadio del cultivo (Helm y Bourne, 2006, da Costa, 2009). Mientras que en proyectos a escalas experimentales y piloto los cultivos de larvas precisan mililitros de microalgas, los tanques de reproductores necesitan varios litros. Es por esta razón que los cultivos de microalgas difieren en escala dependiendo del estadio al que se quiera alimentar: pequeña escala para las larvas (menos de 5 l diarios) y escala masiva para los reproductores (más de 50 l diarios). Por otra parte, los cultivos masivos de microalgas son llevados a cabo en laboratorios con condiciones como la temperatura mucho más variable (invernaderos) que aquellos que se realizan a escala pequeña (laboratorios con temperatura controlada). Por las dimensiones de los cultivos masivos es muy poco probable que sean realizados en laboratorios bajo condiciones estables de temperatura. Asimismo, dado que son los grandes volúmenes de agua los que amortiguan las fluctuaciones térmicas de los cultivos, no es posible desarrollar cultivos a pequeña escala en instalaciones tipo invernadero. Es por esto que para poder determinar las proporciones correctas de cada especie de microalga en la dieta es necesario conocer cómo varía la composición bioquímica y el perfil de ácidos grasos

entre estos dos tipos de cultivos experimentales.

El objetivo de este estudio es determinar si la escala y la temperatura de cultivo actuando en forma conjunta modifican la composición bioquímica y el perfil de ácidos grasos de tres especies de microalgas usadas en la mayoría de los criaderos de bivalvos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de cultivo de las microalgas

Se realizaron cultivos monoespecíficos en sistemas tipo *batch* de tres especies de microalgas: *Isochrysis galbana* (Iso), *Tetraselmis* sp. (Tetra), y *Chaetoceros* sp. (Chaeto) (*Isochrysis galbana* Parke LMPA 08 origen USA, *Tetraselmis* sp. Stein LMPA 27 origen Alemania, *Chaetoceros* sp. Paulsen LMPA 18 origen Mar del Plata; Laboratorio de Microalgas, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Sede Trelew, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco). Para la realización de los experimentos se utilizó agua de mar filtrada a 1 micra mediante sistema de filtrado con cartuchos de espuma de polipropileno (10, 5 y 1 micra en forma consecutiva). La salinidad del agua fue ajustada a 24 ppm y se fertilizó con medio de cultivo F/2 de Guillard utilizando 1 ml de fertilizante por cada litro de agua de mar. En el caso

específico del cultivo de la diatomea (*Chaetoceros* sp.) se agregó 1 ml de solución de metasilicato de sodio nonahidratado - $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ - por cada litro de agua de mar (Guillard y Ryther, 1962). El fotoperiodo se fijó en 24:0 luz-oscuridad.

Las microalgas fueron cultivadas bajo dos condiciones que combinaban la escala de producción y la temperatura: i) pequeña escala y 24°C, y ii) escala masiva y temperatura variable.

En el primer tratamiento las microalgas fueron cultivadas en contenedores de 3 l con 1 l de agua de mar fertilizada a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ que de aquí en más llamaremos cultivos a escala pequeña (P). En el segundo tratamiento las microalgas fueron cultivadas en tanques de 140 l con 100 l de agua de mar fertilizada y sin control térmico (la temperatura fluctuaba en concordancia con la variación térmica de la sala de cultivo), de aquí en más cultivos a escala masiva (M). Cada especie de microalga fue cultivada bajo ambos tratamientos y en total fueron llevados a cabo seis cultivos.

Las tasas de crecimiento de los cultivos fueron estimadas mediante el cálculo de la densidad celular utilizando un microscopio óptico y una cámara de Neubauer. Las microalgas fueron cosechadas cuando alcanzaron la fase estacionaria del crecimiento y

concentradas utilizando una centrífuga de temperatura controlada Sorvall RC5C a una temperatura de entre 15 y 20°C. Mientras que Iso y Chaeto fueron centrifugadas a una velocidad de 7000 RPM, Tetra se centrifugó a 5000 RPM ya que por su mayor tamaño requería menor velocidad para su precipitación. A pesar de que Iso y Tetra eran plausibles de ser concentradas mediante floculación usando hidróxido de sodio para aumentar el pH del medio de cultivo, este método fue descartado debido a que el mismo interferiría con la posterior extracción de lípidos y produciría modificaciones en el perfil de ácidos grasos (Borges *et al.*, 2016).

Debido a que diversos estudios no han podido detectar diferencias en la composición bioquímica y el perfil de ácidos grasos entre métodos de secado de las microalgas (Ryckebosch *et al.*, 2011, Stramarkou *et al.*, 2017) y dependiendo de la disponibilidad del equipamiento necesario, los concentrados de microalgas fueron secados utilizando dos métodos distintos. Algunas de las muestras fueron colocadas en tubos falcon, congeladas en un ultrafreezer a -80°C y luego secadas en liofilizador, y otras fueron colocadas en estufa a 60°C . Ambos conjuntos de muestras fueron removidas cuando las mismas alcanzaron peso constante. Luego cada

muestra fue molida utilizando un mortero de porcelana.

Análisis bioquímicos

Tres muestras secas de cada combinación de especie-tratamiento fueron analizadas para determinar la composición bioquímica y el contenido de cenizas de las mismas. Los resultados fueron expresados como la media (\pm DE) de peso de porcentaje de tejido seco.

Análisis de lípidos totales

Los lípidos totales fueron determinados utilizando el método colorimétrico de Zöllner y Kirsch (1962) utilizando el reactivo vainillin- ácido fosfórico- ácido sulfúrico y colesterol como estándar.

Se pesaron 10 mg de muestra seca y se hirvió durante 10 minutos en ácido sulfúrico concentrado. Luego de enfriada a temperatura ambiente, 50 μ L de la solución recibió 1 ml de reactivo de color (conteniendo 11,9 molL⁻¹ de ácido fosfórico y 8 mmolL⁻¹ de vainillin). La absorbancia fue medida a 530 nm.

Análisis de proteínas

El contenido de proteína soluble fue medido siguiendo la metodología descrita en Lowry et al. (1951) usando serum de albúmina bovina como estándar. Se pesaron 10 mg de muestra seca que fue luego digerida con hidróxido de sodio 1 N durante 24 horas a temperatura ambiente. Luego una

alícuota del extracto de muestra digerida fue reaccionado con una solución de cobre alcalino (reactivo cobre- tartárico que contenía CuSO₄, tartrato de sodio y potasio y Na₂CO₃) seguido por la adición de Folin-Ciocalteu diluida (1:1 v/v) y la absorbancia fue medida a 750 nm.

Análisis de carbohidratos

El contenido de carbohidratos fue determinado siguiendo la metodología de colorimetría descrita en Dubois et al. (1956). Las muestras fueron procesadas con ácido tricloroacético al 5% y agregado al fenol al 5% y a una alícuota de ácido sulfúrico concentrado. Como estándar fue usado glicógeno y la absorbancia fue medida a 490 nm.

Cuantificación de cenizas

La cantidad de cenizas para cada muestra seca fue determinada por combustión durante 5 horas a 550°C en un horno de mufla (AOAC, 2005).

Análisis de ácidos grasos

Los ácidos grasos fueron determinados por cromatografía gaseosa-líquida en un cromatógrafo gaseoso con detector de espectrometría de masas (Thermo Scientific FOCUS/ISQ). Los metil-ésteres fueron preparados usando el método de transesterificación directa (Lepage y Roy, 1986). El cromatógrafo gaseoso fue calibrado usando una mezcla de estándares de ácidos grasos. Se aplicó un factor de corrección para compensar

la baja respuesta del detector de ionización a los ácidos grasos insaturados relativa a los pesos correspondientes de los ácidos grasos saturados.

Análisis estadísticos

Composición bioquímica y contenido de cenizas

Las diferencias entre tratamientos para cada componente (lípidos, proteínas y carbohidratos) fueron probadas estadísticamente con Kruskal-Wallis. Las comparaciones de a pares fueron hechas usando el test de Dunn. Se aplicó el test de Wilcox para cada componente y especie con el fin de detectar diferencias entre tratamientos.

Ácidos grasos

Los ácidos grasos fueron agrupados por su grado de saturación para poder realizar un análisis relativo de los porcentajes de ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MFA) y los ácidos grasos poliinsaturados esenciales (PUFA, familias (n - 3) y (n - 6)). Las comparaciones entre cada compuesto

para cada combinación especie-tratamiento fue llevado a cabo con un test de Kruskal-Wallis. Las diferencias para cada agrupación de ácidos grasos y los cocientes (SFA+MFA)/PUFA y (n - 3)/(n - 6) entre tratamientos fueron testeados con el test de Wilcox. Además se realizó un test de PERMANOVA y un análisis SIMPER para todos los datos y cada especie entre tratamientos usando el programa PRIMER (Clarke y Gorley, 2001). Todos los valores fueron transformados usando la raíz cuarta.

RESULTADOS

Condiciones de cultivo de las microalgas

Mientras que en los cultivos a escala pequeña (P) los tratamientos fueron realizados en una sala con temperatura controlada de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, en los cultivos a escala masiva (M) la temperatura del cultivo fluctuó entre $7,9^\circ\text{C}$ a $30,6^\circ\text{C}$: medida y registrada en forma horaria mediante un *datalogger*. En este último tratamiento la temperatura media fue de $15,8^\circ\text{C}$ con fluctuaciones diarias (Figura 1).

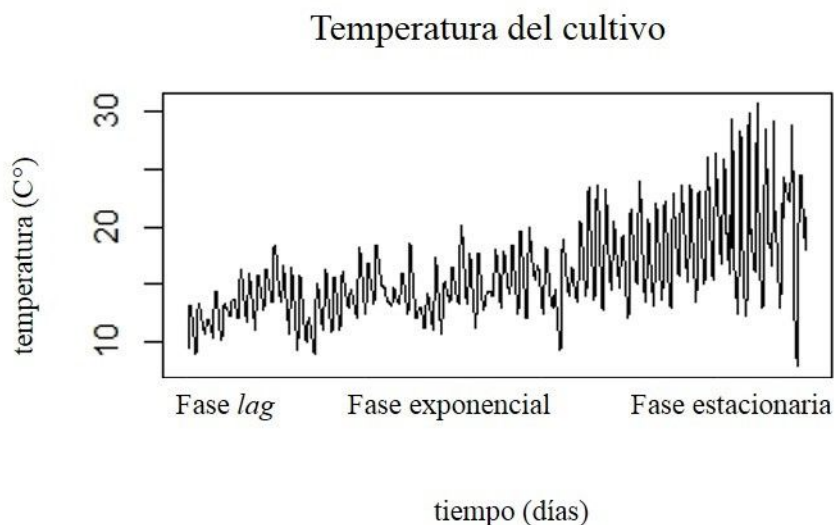


Figura 1. Fluctuación térmica en los cultivos a escala masiva (M). En el eje de las abscisas se grafica el tiempo en días (señalando las distintas fases del crecimiento) y en el eje de las ordenadas la temperatura registrada en grados centígrados.

Figure 1. Thermal fluctuation in massive scale cultures (M). On abscissa axis, time is plotted in days (indicating the different stages of growth) and ordinates axis indicate temperature recorded in degrees centigrade.

Composición bioquímica y contenido de cenizas

Todas las especies de microalgas presentaron como principal componente las proteínas solubles. Iso y Chaeto presentaron más de 10% de lípidos solubles. Mientras que los cultivos a pequeña escala de Iso contuvieron más lípidos que los de escala masiva, en Chaeto sucedió lo opuesto. Tetra fue la especie que mostró los menores niveles de lípidos y Chaeto fue la especie con los

valores más bajos para carbohidratos de las tres analizadas. Con respecto al contenido de cenizas, Chaeto fue la especie con mayor contenido, seguida por Iso y Tetra. Chaeto e Iso mostraron los mayores valores en contenido de cenizas en los cultivos a pequeña escala mientras que en Tetra se observó lo opuesto. La composición bioquímica y el contenido de cenizas para cada combinación de especie-tratamiento son presentados en la tabla 1.

Tabla 1. Análisis químico proximal (% peso seco) de las tres especies de microalgas cultivadas bajo dos condiciones diferentes: escala pequeña a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (P) y escala masiva con temperatura variable (M) (media \pm DE, n=3). CH = carbohidratos. DE = desvío estándar.

Table 1. Proximate chemical analysis (% dry weight) of the three microalgae species cultured under two different conditions: low scale at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (P) and massive scale with variable temperature (M) (mean \pm SD, n=3). CH = carbohydrate. SD = Standard deviation.

Especie	Tratamiento	Abreviatura	Lípidos (%)	Proteínas (%)	CH (%)	Cenizas (%)
<i>Isochrysis galbana</i> (Iso)	Escala pequeña	Iso (P)	15.16 \pm 0.75	44.12 \pm 2.00	15.95 \pm 0.51	35.69 \pm 1.10
	Escala masiva	Iso (M)	10.37 \pm 1.48	43.64 \pm 1.70	14.13 \pm 0.62	23.17 \pm 1.50
<i>Chaetoceros</i> sp. (Chaeto)	Escala pequeña	Chaeto (P)	12.14 \pm 1.29	55.37 \pm 5.48	4.85 \pm 0.60	40.69 \pm 1.44
	Escala masiva	Chaeto (M)	18.62 \pm 2.00	31.95 \pm 1.94	6.96 \pm 0.58	36.46 \pm 0.19
<i>Tetraselmis</i> sp. (Tetra)	Escala pequeña	Tetra (P)	9.20 \pm 2.50	38.17 \pm 7.17	22.53 \pm 0.87	17.11 \pm 1.79
	Escala masiva	Tetra (M)	5.21 \pm 2.03	38.53 \pm 1.25	14.65 \pm 7.07	19.70 \pm 0.53

Isochrysis galbana cultivada bajo dos tratamientos

En ambos tratamientos las proteínas fueron el compuesto más abundante (44,12% en pequeña escala y 43,64% en escala masiva) con significativamente mayores cantidades que carbohidratos (15,95% en pequeña escala y 14,13% en escala masiva) y lípidos (15,16% en escala pequeña y 10,37% en escala masiva), Kruskal-Wallis, test de Dunn ($\alpha=0,05$). Mientras que en el tratamiento a escala pequeña los lípidos y los carbohidratos no presentaron diferencias

significativas porcentuales entre sí, las proteínas sí diferían en porcentajes con aquellos dos. En el tratamiento a escala masiva todos los componentes presentaron diferencias significativas entre sí (Figura 2). Ninguno de los compuestos mostraron diferencias significativas entre tratamientos (test de Wilcoxon, lípidos $p=0,1$, proteínas $p=0,7$ y carbohidratos $p=0,1$), y los porcentajes de cenizas fueron similares entre tratamientos no observándose tampoco diferencias significativas (test de Wilcoxon $p=0,1$).

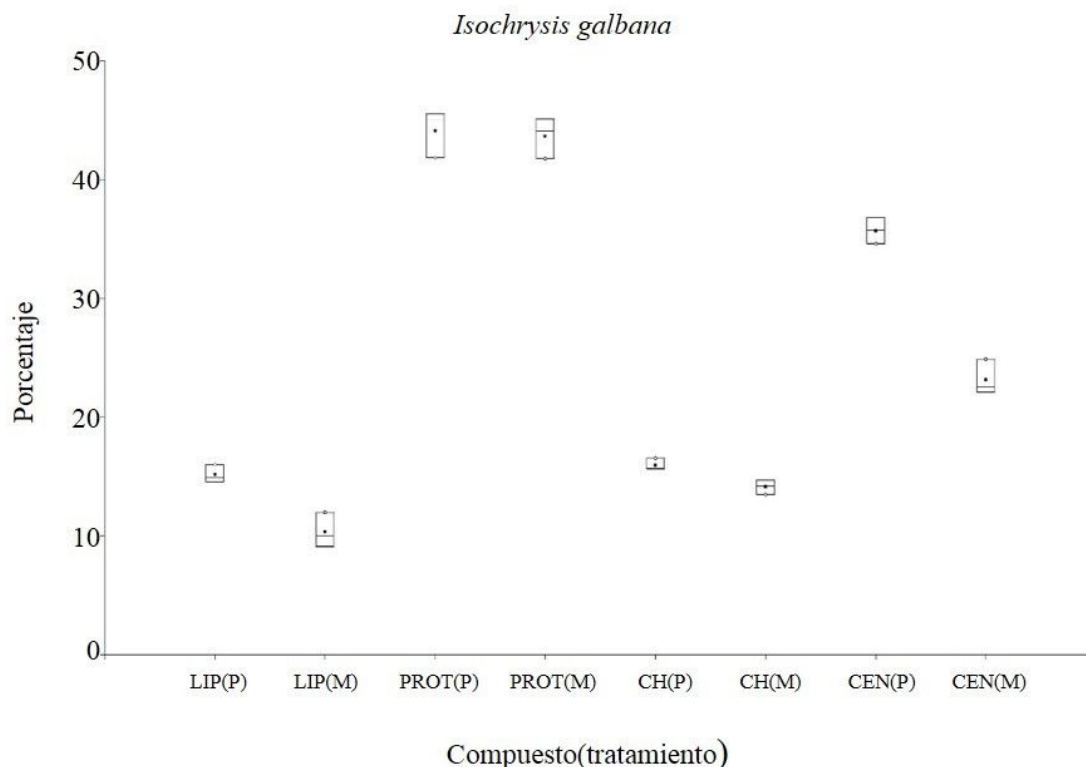


Figura 2. Perfil bioquímico y contenido de cenizas de *Isochrysis galbana*. Media y desvío estándar para cada componente: lípidos (LIP), proteínas (PROT), carbohidratos (CH) y cenizas (CEN) de cultivos de microalgas bajo dos tratamientos distintos, pequeña escala a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (P) y escala masiva con temperatura variable (M)

Figure 2. *Isochrysis galbana* biochemical profile and ash. Mean and standard deviation of each component: lipid (LIP), protein (PROT), carbohydrate (CH) and ash (CEN) of microalgae cultured under different scale condition, low (P) and massive scale (M).

Chaetoceros sp. cultivada bajo dos tratamientos

En ambos tratamientos *Chaetoceros sp.* presentó en orden decreciente de porcentajes: proteínas, lípidos y carbohidratos (todos los componentes presentaron diferencias significativas entre ellos Kruskal-Wallis, test de Dunn, $\alpha=0,05$) (Figura 3). Los cultivos a pequeña escala presentaron un mayor porcentaje de proteínas (55,37%), y en un menor porcentaje lípidos (12,14%) y carbohidratos (4,85%). Por otra parte, los cultivos a escala masiva presentaron un

porcentaje menor de proteínas (31,95%) y un mayor porcentaje de lípidos (18,62%) que el primer tratamiento, y porcentajes similares de carbohidratos (6,96%). A pesar de las variaciones observadas entre componentes en cada tratamiento, no hubo diferencias significativas entre tratamientos para cada componente en particular (test de Wilcox $p=0,1$ para todos los análisis), y el contenido de cenizas tampoco presentó diferencias entre tratamientos (test de Wilcox $p=0,1$).

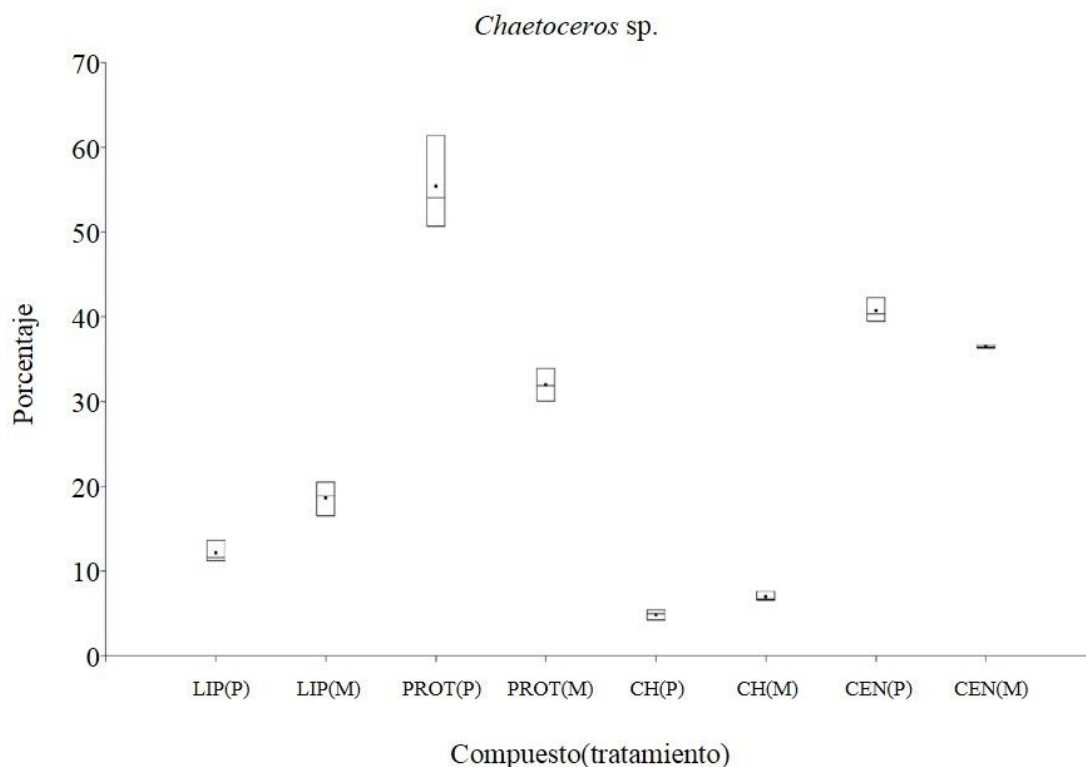


Figura 3. Perfil bioquímico y contenido de cenizas de *Chaetoceros* sp. Media y desvío estándar para cada componente: lípidos (LIP), proteínas (PROT), carbohidratos (CH) y cenizas (CEN) de cultivos de microalgas bajo dos tratamientos distintos, pequeña escala a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (P) y escala masiva con temperatura variable (M)

Figure 3. *Chaetoceros* sp. biochemical profile and ash. Mean and standard deviation of each component: lipid (LIP), protein (PROT), carbohydrate (CH) and ash (CEN) of microalgae cultured under different scale condition, low (P) and massive scale (M).

Tetraselmis sp. cultivada bajo dos tratamientos

Ambos tratamientos mostraron diferencias significativas entre los distintos componentes (Kruskal-Wallis, test de Dunn, $\alpha=0,05$), y presentaron en orden decreciente de porcentajes: proteínas (38,17% en escala pequeña y 38,53% en escala masiva), carbohidratos

(22,53% en escala pequeña y 14,65% en escala masiva) y lípidos (9,20% en pequeña escala y 5,21% en escala masiva) (Figura 4). Ni los distintos componentes (test de Wilcoxon $p>0,05$ para todos ellos) ni el contenido de cenizas (test de Wilcoxon $p=0,1$) presentaron diferencias entre tratamientos.

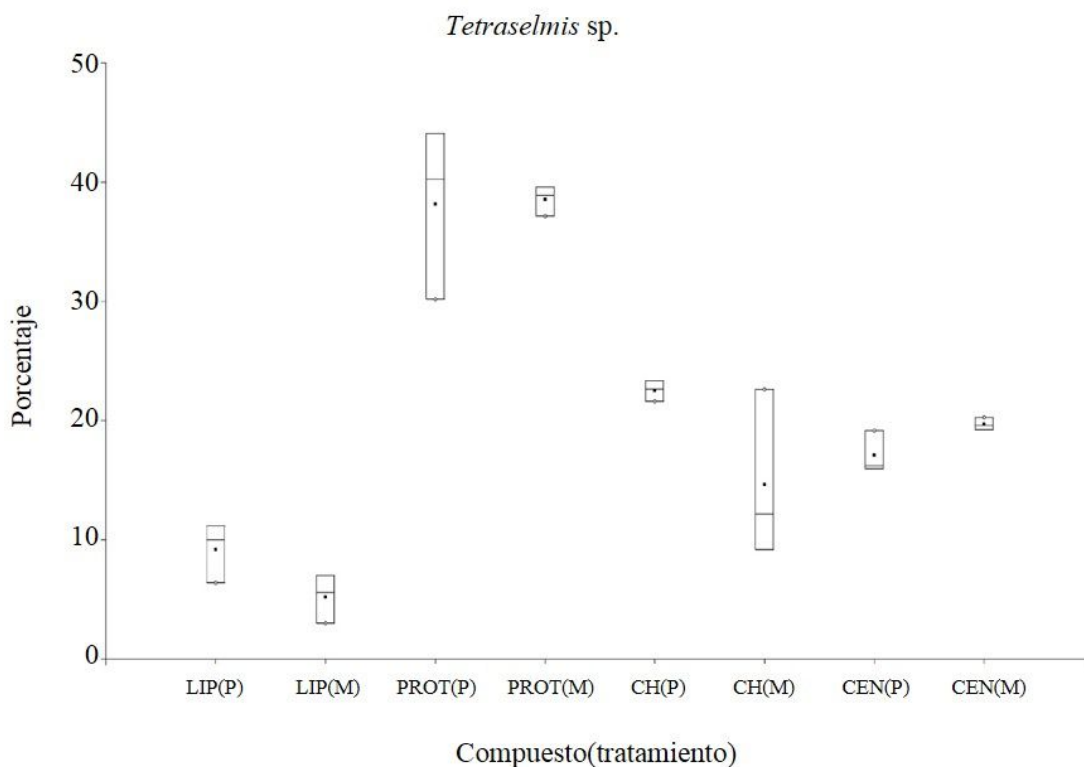


Figura 4. Perfil bioquímico y contenido de cenizas de *Tetraselmis* sp. Media y desvío estándar para cada componente: lípidos (LIP), proteínas (PROT), carbohidratos (CH) y cenizas (CEN) de cultivos de microalgas bajo dos tratamientos distintos, pequeña escala a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (P) y escala masiva con temperatura variable (M)

Figure 4. *Tetraselmis* sp. biochemical profile and ash. Mean and standard deviation of each component: lipid (LIP), protein (PROT), carbohydrate (CH) and ash (CEN) of microalgae cultured under different scale condition, low (P) and massive scale (M).

Ácidos grasos

Los ácidos grasos (FA) detectados presentaron entre 14 y 24 carbonos en su cadena (Tabla 2). El ácido graso predominante, extraíble por solvente, fue el ácido oléico C18:1n-9c (11,56% a 26,66%), excepto en Chaeto el cual presentó grandes proporciones de ácido palmitoléico C16:1n-7c (24,92% en promedio entre los dos tratamientos) y bajas proporciones de ácido oléico (menos de 1,31%). El segundo en abundancia fue el ácido eicosapentaenóico (EPA; 20:5n-3c

(13,67% a 23,11%) excepto en Chaeto (menos del 3,11%). El ácido palmítico (C16:0) se halló en grandes proporciones en todas las especies analizadas (9,96% a 18,33%). El ácido docosahexaenóico (DHA; C22:6 n-3c) se encontró en forma abundante en Iso (en ambos tratamientos) y en bajas proporciones en Chaeto y Tetra (4,62% y 0,12% en promedio respectivamente). El cultivo de Iso a escala masiva presentó 22:5n-6c (7,04%), C16:2n-6c (3,79%) y 16:3n-3c (3,36%) mientras que ni en Iso a pequeña escala ni en las dos restantes especies

fueron detectados. C20:1n-9c no se detectó en Chaeto (en ninguno de los tratamientos) pero sí se detectó en las dos restantes especies (8,66% en Tetra y 0,29% en Iso en promedio entre ambos tratamientos). C16:4n-3c fue detectable solo en Tetra a escala masiva y C20:4n-3c sólo en el cultivo a baja escala de Iso. Chaeto fue la especie que mostró mayores porcentajes de ácido araquidónico (ARA; C20:4n-6c) (6,90% y 3,41% en pequeña escala y escala masiva respectivamente). Mientras que los ácidos γ -linoléico (GLA; C18:3n-6c) y el linoléico (LA; C18:2n-6c) fueron detectables en ambas escalas de cultivo de Chaeto, C18:3n-6c en las restantes dos especies sólo se encontró en la escala masiva y C18:2n-6c sólo en Tetra cultivada a escala masiva pero en muy bajo porcentaje (0,6%).

Ninguna de las agrupaciones por grado de saturación de ácidos grasos mostró diferencias entre tratamientos en ninguna de las especies (Kruskal-Wallis, test de Dunn, $\alpha=0,05$). La agrupación de ácidos grasos que presentó menos diferencias entre tratamientos fue (n – 3) (Kruskal-Wallis, test de Dunn, $p=0,7$

para todas las especies). Tetra fue la especie que presentó menos diferencias para cada agrupación de ácidos grasos entre tratamientos (Kruskal-Wallis, test de Dunn, $p=0,7$ para SFA, MFA y n – 3 y $p=0,4$ para n – 6).

Ninguno de los cocientes analizados (SFA+MUFA)/PUFA y (n – 3)/(n – 6), presentaron diferencias entre tratamientos (test de Wilcox, $p=0,1$ para todos ellos).

Todas las especies mostraron diferencias en la composición de ácidos grasos analizados en forma agrupada por grado de saturación (PERMANOVA, $p=0,0001$). Las diferencias entre tratamientos para cada especie fue no significativa (PERMANOVA, $p=0,1023$; $p=0,0999$ y $p=0,1041$ para Iso, Chaeto y Tetra respectivamente).

Cada especie presentó altos porcentajes de similitud entre sí (SIMPER, 86,73%; 93,82% y 88,32% para Iso, Chaeto y Tetra respectivamente). Asimismo cada especie mostró bajos porcentajes de disimilitud entre tratamientos (SIMPER, 21,13% Iso; 8,69% Chaeto y 17,26% Tetra).

Tabla 2. Composición de ácidos grasos para *Isochrysis galbana* (Iso), *Chaetoceros* sp. (Chaeto) y *Tetraselmis* sp. (Tetra) cultivadas bajo dos diferentes condiciones: escala pequeña a 24±1°C (P) y escala masiva con temperatura variable (M) (valores medios expresados como porcentaje del peso seco en gr, n=3).

Table 2. Fatty acid composition for *Isochrysis galbana* (Iso), *Chaetoceros* sp. (Chaeto) and *Tetraselmis* sp. (Tetra) cultured under two rearing conditions: low scale at 24 ± 1°C (P) and massive scale with variable temperature (M) (mean values expressed as percentages of dry weight in gr, n=3).

Ácidos grasos (%)	Iso (P)	Chaeto (P)	Tetra (P)	Iso (M)	Chaeto (M)	Tetra (M)
Saturados (SFA)						
C14:0	7.82	8.64	2.23	6.34	8.79	5.03
C15:0	1.30	1.99	2.62	1.15	2.49	1.65
C16:0	10.12	10.21	18.33	9.96	15.16	16.53
C17:0	0.48	0.46	0.84	0.42	0.40	0.63
C18:0	1.06	5.05	1.85	0.69	2.66	1.42
C20:0	0.45	0.56	0.10	1.28	0.58	0.07
C22:0	1.89	1.69	0.05	0.32	1.01	0.07
C23:0	0.33	0.06	0.01	0.18	0.00	0.03
C24:0	0.02	2.76	0.36	0.08	0.94	0.32
Total SFA	23.48	31.42	26.38	20.42	32.02	25.74
Monoinsaturados (MUFA)						
C14:1n-5c	0.00	0.09	0.16	0.04	1.24	0.77
C15:1n-5c	0.02	0.21	0.02	0.01	0.26	0.03
C16:1n-7c	4.61	23.09	4.21	4.48	26.76	14.27
C17:1n-7c	1.16	0.13	0.31	0.50	0.39	0.25
C18:1n-9c	21.59	0.71	26.66	11.56	1.31	17.92
C18:1n-9t	1.33	2.26	3.73	2.52	2.54	3.54
C20:1n-9c	0.32	0.00	9.41	0.26	0.00	7.92
C22:1n-9c	1.76	0.07	0.09	0.80	0.07	0.06
C24:1n-9c	0.06	0.16	0.01	0.05	0.16	0.01
Total MFA	30.85	26.74	44.59	20.22	32.74	44.77
Polinsaturados (PUFA) (n – 3)						
C16:4n-3c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	12.88
C16:3n-3c	0.00	0.00	0.00	3.36	0.00	0.00
C18:4n-3c	0.00	0.08	4.97	4.45	0.60	0.72
C20:4n-3c	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:5n-3c	3.11	23.11	20.92	2.37	22.76	13.67
C22:6n-3c	41.19	4.99	0.18	32.89	4.26	0.06
Total (n – 3)	44.35	28.17	26.07	43.06	27.62	27.32

(n – 6)						
C16:2n-6c	0.00	0.00	0.00	3.79	0.00	0.00
C18:3n-6c	0.00	5.35	0.00	4.60	2.72	0.06
C18:2n-6c	0.00	1.04	0.00	0.00	1.20	0.59
C20:4n-6c	0.47	6.90	1.97	0.41	3.41	1.24
C20:3n-6c	0.42	0.36	0.98	0.10	0.25	0.21
C20:2n-6c	0.32	0.00	0.00	0.28	0.00	0.07
C22:5n-6c	0.00	0.00	0.00	7.04	0.00	0.00
C22:2n-6c	0.12	0.00	0.01	0.08	0.04	0.00
Total (n – 6)	1.32	13.66	2.95	16.30	7.62	2.17
(SFA+MFA)/ PUFA	1.19	1.39	2.45	0.68	1.84	2.39
(n – 3)/(n – 6)	33.66	2.06	8.84	2.64	3.63	12.60

DISCUSIÓN

La alimentación de los bivalvos criados en condiciones de cultivo requiere de las cantidades apropiadas de alimento con las adecuadas proporciones de componentes químicos para satisfacer sus requerimientos alimenticios. Para alcanzar los requerimientos nutricionales óptimos es necesaria la elección cuidadosa de la combinación de especies de microalgas teniendo en cuenta las condiciones en que estas han sido cultivadas. Las especies de microalgas analizadas en este experimento son frecuentemente utilizadas para alimentar organismos marinos en condiciones de cultivo. Estas especies de microalgas cumplen los requerimientos necesarios para ser cultivadas como alimento en criaderos de bivalvos desde la escala experimental hasta la producción a

escala comercial (Helm y Bourne, 2006, da Costa, 2009).

Cuando los cultivos de microalgas monoespecíficos y axénicos son llevados a cabo para alimentar diferentes cultivos experimentales, a menudo la producción de las distintas escalas se desarrolla en salas diferentes. Las diferentes escalas de producción poseen características distintivas: usualmente las producciones a pequeña escala se realizan en salas con temperatura controlada mientras que la escala de producción masiva se realiza en invernaderos (de mayor tamaño que los laboratorios de temperatura controlada) con temperatura más variable. Considerando que bajo condiciones no controladas de temperatura solo los cultivos masivos de microalgas pueden ser llevados a cabo debido a su capacidad de amortizar las fluctuaciones térmicas, debe ser tenido

en cuenta también que otros efectos además del térmico pueden estar actuando. Por ejemplo, la escala como tratamiento puede estar enmascarando la irradiancia que cada microalga recibe (efecto sombra) y es necesario tener en cuenta que la irradiancia es un factor determinante en la composición bioquímica de las microalgas (Sukenik y Wahnnon, 1991, Carvalho *et al.*, 2009). Asimismo, más frecuentemente de lo deseado sucede que los cultivos de microalgas se contaminan, ya sea con otras especies de microalgas, por bacterias o por otros organismos. Dado que las distintas escalas de cultivo se realizan en salas separadas es poco probable que ambas escalas de producción se contaminen al mismo tiempo. Cuando los cultivos se contaminan es necesario usar la otra escala de producción de microalgas para continuar alimentando los organismos de la experiencia. Es por esto que en cultivos experimentales la información acerca de la composición bioquímica y sus modificaciones relacionadas con las condiciones de cultivo en las que se desarrollen resulta vital en la experimentación en criadero (Volkman *et al.*, 1989).

Nuestros resultados muestran que las diferentes condiciones de cultivo, como la escala y las fluctuaciones térmicas, no

modifican significativamente la composición bioquímica de estas tres especies de microalgas en las diferentes experiencias realizadas en condiciones de laboratorio. De acuerdo con Brown *et al.* (1997) y Renaud *et al.* (1999), los lípidos y las proteínas siguen los mismos patrones de abundancia que nuestros experimentos a pequeña escala en términos de las especies analizadas. Sin embargo, los cultivos a escala masiva no presentaron el mismo patrón reportado por los autores antes mencionados. En cuanto a los carbohidratos, ambos tratamientos presentaron abundancias consistentes con lo reportado por Brown *et al.* (1997), pero es diferente a lo reportado por Renaud *et al.* (1999) para las mismas especies. Debido a que las diferencias en los distintos compuestos analizados en nuestros experimentos (lípidos, proteínas, carbohidratos y cenizas) fueron estadísticamente no significativas para todas las especies entre tratamientos, se puede pensar que el diseño de una dieta basada en la composición bioquímica de microalgas es dependiente de la especie, entre otras cosas, y es independiente de la escala y la estabilidad de la temperatura de cultivo.

Como con la composición bioquímica, el perfil de ácidos grasos (cuando estos se encuentran agrupados considerando el

grado de saturación y se tiene en cuenta si pertenecen a la familia (n – 3) o (n – 6)) de las tres especies de microalgas analizadas no presenta diferencias significativas entre tratamientos (escala y estabilidad térmica en forma conjunta). Además ambos cocientes analizados - (SFA+MFA)/PUFA y (n – 3)/(n – 6)- no difieren estadísticamente entre tratamientos. Valores bajos del cociente (SFA+MFA) /PUFA y mayores que dos del cociente (n – 3)/(n – 6) son óptimos para la alimentación de larvas de bivalvos como por ejemplo ostras (Mitra *et al.*, 2015), por lo que todas las especies y todos los tratamientos estudiados son potencialmente buenos para ser utilizados como alimento de bivalvos. Sin embargo, el perfil de ácidos grasos mostró diferencias en las cantidades para cada agrupación de ácidos grasos por grado de saturación para cada especie-tratamiento analizado. Por otra parte, se observan sutiles diferencias entre tratamientos en dos de los más importantes ácidos grasos esenciales (EPA y DHA). Mientras que EPA permanece prácticamente constante entre tratamientos en *I. galbana* y *Chaetoceros* sp., decrece su porcentaje en la escala masiva de *Tetraselmis* sp. Más aún, los niveles de DHA son elevados en *I. galbana* pero la escala masiva tiene menores porcentajes que la

escala pequeña. Algunos ácidos grasos son considerados esenciales debido a que los organismos marinos parecen tener limitaciones para sintetizar PUFA a partir de ácidos grasos menos insaturados como precursores como el ácido linoléico (Kanazawa *et al.*, 1979), y aún sin tener un absoluto requerimiento dietario estricto, los mismos aumentan las tasas de crecimiento y la supervivencia larval cuando son incluidos en la dieta (Rodgers y Barlow, 1987). Es por esto que las sutiles diferencias en los contenidos de ácidos grasos considerados esenciales deben ser consideradas a la hora de determinar las dietas óptimas para cada estadio del cultivo de los bivalvos.

CONCLUSIONES

La composición bioquímica de cada especie de microalga no cambia en forma significativa con las dos condiciones de cultivo probadas. Los perfiles de ácidos grasos presentan sutiles pero evidentes diferencias entre sí, especialmente en aquellos ácidos grasos considerados esenciales. Con la información obtenida se pueden diseñar las dietas más apropiadas para cada estadio del cultivo en moluscos bivalvos.

AGRADECIMIENTOS

A Nancy Verdecchia del CRIAR (Las Grutas, Río Negro) y a Walter Helbling de la Estación de Fotobiología de Playa Unión por aportar las cepas de las microalgas utilizadas en estos

experimentos. A la Red de Fortalecimiento de la Maricultura Costera Patagónica (RFMCP) cuyas ayudas económicas han permitido en parte solventar este experimento.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC. 2005. Official method of Analysis (18th Edition). Association of Officiating Analytical Chemists, Washington DC, 2590 pp.

Borges, L., S. Caldas, M.G.M. D'Oca & P.C. Abreu. 2016. Effect of harvesting processes on the lipid yield and fatty acid profile of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Aquaculture Reports*, **4**: 164-168.

Brown, M., C. Garland, S. Jeffrey, I. Jameson & J. Leroi. 1993. The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T. ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *J. Appl. Phycol.*, **5** (3): 285-296.

Brown, M., S. Jeffrey, J. Volkman & G. Dunstan. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, **151** (1-4): 315-331.

Brown, M.R. 2002. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. **3**: 281-292.

Brown, M.R., G.A. Dunstan, S. Jeffrey, J.K. Volkman, S.M. Barrett & J.M. LeRoi. 1993. The influence of irradiance on the biochemical composition of the Prymnesiophyte *Isochrysis* sp. (Clone T ISO). *J. Phycol.*, **29** (5): 601-612.

Carvalho, A.P., C.M. Monteiro & F.X. Malcata. 2009. Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*. *J. Appl. Phycol.*, **21** (5): 543-552.

Clarke, K.R. & R.N. Gorley. 2001. Primer V5 (Plymouth routines in multivariate ecological research): user manual/tutorial, Primer-E.

da Costa, F. 2009. Optimización del cultivo en criadero de navaja ("*Ensis arcuatus*" Jeffreys, 1865), longueirón ("*E. siliqua*" Linneo, 1758) y longueirón vello ("*Solen marginatus*" Pennant, 1777): composición bioquímica y de ácidos grasos en los desarrollos larvarios, Universidade de Santiago de Compostela.

Darriba, S., F. San Juan & A. Guerra. 2005. Energy storage and utilization in relation to the reproductive cycle in the razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865). *ICES J. Mar. Sci.*, **62** (5): 886-896.

Enright, C., G. Newkirk, J. Craigie & J. Castell. 1986. Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros gracilis* Schütt of varied chemical composition. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **96** (1): 15-26.

Gatenby, C.M., D.M. Orcutt, D.A. Kreeger, B.C. Parker, V.A. Jones & R.J. Neves. 2003. Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels. *J. Appl. Phycol.*, **15** (1): 1-11.

Guillard, R.R.L. & J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, **8** (2): 229-239.

Helm, M., D. Holland & R. Stephenson. 1973. The effect of supplementary algal feeding of a hatchery breeding stock of *Ostrea edulis* L. on

- larval vigour. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **53** (3): 673-684.
- Helm, M.M. & N. Bourne. 2006. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. Roma, Italia, 184 pp.
- Hoff, F.H. & T.W. Snell. 1989. Plankton culture manual. 186 pp.
- Huerlimann, R., R. De Nys & K. Heimann. 2010. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale up production. *Biotechnol. Bioeng.*, **107** (2): 245-257.
- Kanazawa, A., S. Teshima & K. Ono. 1979. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, **63** (3): 295-298.
- Kreeger, D., A. Hawkins, B. Bayne & D. Lowe. 1995. Seasonal variation in the relative utilization of dietary protein for energy and biosynthesis by the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*: 177-184.
- Langdon, C. & M. Waldock. 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **61** (2): 431-448.
- Lepage, G. & C.C. Roy. 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.*, **27** (1): 114-120.
- Li, Q., L. Yang, Q. Ke & L. Kong. 2011. Gametogenic cycle and biochemical composition of the clam *Macra chinensis* (Mollusca: Bivalvia): Implications for aquaculture and wild stock management. *Mar. Biol. Res.*, **7** (4): 407-415.
- Martínez-Fernández, E. & P.C. Southgate. 2007. Use of tropical microalgae as food for larvae of the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Aquaculture*, **263** (1): 220-226.
- Mitra, M., S.K. Patidar, B. George, F. Shah & S. Mishra. 2015. A euryhaline *Nannochloropsis gaditana* with potential for nutraceutical (EPA) and biodiesel production. *Algal Res.*, **8**: 161-167.
- Morris, R., M. McCartney & G. Robinson. 1983. Studies of a spring phytoplankton bloom in an enclosed experimental ecosystem. I. Biochemical changes in relation to the nutrient chemistry of water. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **70** (3): 249-262.
- Ogbonna, J.C. & H. Tanaka. 1996. Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Ferment. Bioeng.*, **82** (6): 558-564.
- Polanco, E., J.F. Polanco & S.M.R. Benito. 2000. La Acuicultura: biología, regulación, fomento, nuevas tendencias y estrategia comercial. Fundación Alfonso Martín Escudero, 246 pp.
- Renaud, S.M., L.-V. Thinh & D.L. Parry. 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*, **170** (2): 147-159.
- Rodgers, L. & C. Barlow. 1987. Better nutrition enhances survival of barramundi larvae. *Aust. Fish.*, **46** (7): 30-32.
- Ryckeboesch, E., K. Muylaert, M. Eeckhout, T. Ruysen & I. Foubert. 2011. Influence of drying and storage on lipid and carotenoid stability of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Agric. Food Chem.*, **59** (20): 11063-11069.
- Saucedo, P., I. Racotta, H. Villarreal & M. Monteforte. 2002. Seasonal changes in the histological and biochemical profile of the gonad, digestive gland, and muscle of the Calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica*

- (Hanley, 1856) associated with gametogenesis. *J. Shellfish Res.*, **21** (1): 127-136.
- Stramarkou, M., S. Papadaki, K. Kyriakopoulou & M. Krokida. 2017. Effect of drying and extraction conditions on the recovery of bioactive compounds from *Chlorella vulgaris*. *J. Appl. Phycol.*, **29** (6): 2947-2960.
- Sukenik, A. & R. Wahnou. 1991. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, **97** (1): 61-72.
- Volkman, J., S. Jeffrey, P. Nichols, G. Rogers & C. Garland. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **128** (3): 219-240.
- Whyte, J.N. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, **60** (3-4): 231-241.
- Whyte, J.N.C., N. Bourne & C.A. Hodgson. 1987. Assessment of biochemical composition and energy reserves in larvae of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **113** (2): 113-124.
- Zhu, C., Y. Lee & T. Chao. 1997. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *J. Appl. Phycol.*, **9** (5): 451-457.
- Zöllner, N. & K. Kirsch. 1962. Colorimetric method for determination of total lipids. *J. Exp. Med.*, **135**: 545-550.

Caracterización fitoquímica y bioactividad de *Chuquiraga aurea* Skotts. (Asteraceae)

Phytochemical characterization and bioactivity of *Chuquiraga aurea* Skotts. (Asteraceae)

Analia Verónica Uhrich¹, Osvaldo León Córdoba², María Luján Flores^{3*}

¹Farmacología II, ²Química Biológica II y ³Farmacognosia, CRIDECIT, GQBMRNP y AAI-CRIDECIT, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Km 4, s/Nº, 9000, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina. *E-mail: mlfl@hotmail.com.ar

RESUMEN

El extracto etanólico de las hojas de *Chuquiraga aurea* se particionó con benceno, cloroformo, éter etílico y acetato de etilo. El extracto crudo y sus fracciones se analizaron mediante reacciones de identificación de grupos químicos, cromatografía y espectrofotometría. La actividad biológica se estudió utilizando la prueba de citotoxicidad de la *Artemia salina*, el ensayo de inhibición del desarrollo radicular de trigo, el ensayo del Metil Green-ADN, la actividad antibacteriana y la antioxidante.

Los principales metabolitos detectados fueron flavonoides, taninos, hidratos de carbono, triterpenos y esteroides. El extracto y sus fracciones fueron citotóxicos contra *Artemia salina* ($CL_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$). El ensayo de inhibición del desarrollo radicular de trigo, que supone una actividad antitumoral, mostró una inhibición del 30 %. Se detectó la posible presencia de metabolitos que se intercalan con el material genético desplazando el MG-ADN. La capacidad antioxidante fue importante en la fracción acuosa final, con una inhibición del 57,8 % del DPPH y una $SC_{50} = 117,6 \mu\text{g/ml}$. Los resultados obtenidos constituyen una contribución novedosa al conocimiento de la especie y guardan relación con los usos en la medicina tradicional Tehuelche.

PALABRAS CLAVES: *Chuquiraga aurea*; *Artemia salina*; Citotoxicidad; Metil Green-ADN.

ABSTRACT

The ethanolic extract of the leaves of the *Chuquiraga aurea* was partitioned with benzene, chloroform, ethyl ether and ethyl acetate. The crude ethanolic extract and all

the fractions were phytochemically screened. Biological activity was assayed by using the *Artemia salina* cytotoxicity test, by studying the inhibitory effect on root elongation, the DNA-Methyl Green assay, antibacterial activity and antioxidant activity.

Flavonoids, tannins, carbohydrates and terpenes were the principal metabolites detected. Extract and their fractions were cytotoxic against *Artemia salina* ($LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$). Inhibition test of wheat root development, which presumes antitumor activity, showed 30 % inhibition. Were detected the presence of components that are interspersed with the genetic material by moving the DNA-MG. Antioxidant capacity was important in aqueous fraction final, it showed 57.8 % inhibition of DPPH and a $SC_{50} = 117.6 \mu\text{g/ml}$. The results achieved constitute a novel contribution to the knowledge of the species and are related to the uses in traditional Tehuelche medicine.

KEY WORDS: *Chuquiraga aurea*; Brine shrimp; Cytotoxicity; DNA-Methyl green.

INTRODUCCIÓN

Las plantas usadas en la medicina tradicional constituyen una importante fuente de recursos para la obtención de nuevos compuestos biológicamente activos.

La biodiversidad vegetal de la Patagonia Argentina está representada por más de 2300 especies; sin embargo aún son escasas las que han sido objeto de estudios científicos integrales incluyendo composición química y bioactividad. En las Asteraceae, la subfamilia Barnadesioideae (Benth. & Hook. f.) K. Bremer & R.K. Jansen, comprende más de 90 especies distribuidas en 9 géneros en América del Sur (Ccana-Ccapatinta et al., 2017). Uno de los géneros representantes de

esta subfamilia en el Distrito Golfo San Jorge de esta región, es *Chuquiraga*.

Chuquiraga es un género austroamericano cuyas especies son en su mayoría arbustos xeromorfos especialmente adaptados a ambientes de déficit hídrico, siendo dominantes en muchas comunidades de las zonas áridas de América del Sur en donde habitan 25 especies (Ezcurra, 1985; Hoeneisen et al., 2000).

Chuquiraga aurea Skotts. es un arbusto de bajo porte y flores amarillas; se la conoce con diversos nombres comunes, destacándose chuquiraga dorada, flor dorada, uña de gato, colchón de suegra. En la Patagonia Argentina se distribuye en las provincias de Río Negro, Chubut y Norte y centro de Santa Cruz. Vegeta en

suelo generalmente arenoso, formando cojines chatos a hemisféricos, a veces fijando montículos sometidos a voladuras o cubriendo suelos erosionados, aunque su presencia es característica en bajos y cañadones (Ezcurra, 1985).

Con respecto a los constituyentes químicos, se han aislado triterpenos de *Chuquiraga atacamensis* y *C. ulicina* (Hoeneisen et al., 2000), y fenoles, destacándose los flavonoides de *C. spinosa* (Arroyo-Acevedo et al., 2017). Mendiondo et al. (1997) describieron que este Género presenta un patrón simple de flavonoides. Ccana-Ccapatinta et al. (2017) mencionan estudios preliminares acerca de la presencia de acetofenonas y saponinas en *C. spinosa*. Así mismo, para esta última especie se ha informado también la presencia de alcaloides aunque los estudios son aún preliminares (Arroyo-Acevedo et al., 2017).

Algunas especies de *Chuquiraga* son ornamentales, pero la mayoría han sido utilizadas por distintas culturas étnicas por sus propiedades medicinales. A *C. jussieui* se le atribuyeron propiedades tónicas, reconstituyentes, diuréticas, y comparables a la quina (*Cinchona sp*) para tratamientos contra la malaria (Ccana-Ccapatinta et al., 2017). *C.*

avellanedae se utilizaba para gargarismos en casos de irritaciones de garganta (Ezcurra, 1985; Ccana-Ccapatinta et al., 2017). A *C. spinosa* además de ser considerada diurética, se le atribuyeron propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas (Casado et al., 2011). *C. lessing* se describe como antiinflamatoria, analgésica, diurética, para el tratamiento de enfermedades prostáticas y en cáncer genitourinario (Ramírez et al., 2014). Las hojas de *C. erinaceae* (especie sinónimo de *C. aurea*, TROPICOS database) eran masticadas por los tehuelches como excitantes. Para *C. aurea* se ha mencionado su importancia como tónico, diurético, antimalárico, reconstituyente.

Teniendo en cuenta los antecedentes señalados, como parte de la investigación integral farmacognóstica de especies vegetales nativas de la Patagonia Argentina descritas en la medicina tradicional, en este trabajo se analizó la composición química de las hojas y se efectuaron los primeros estudios de actividad biológica in vitro de *Chuquiraga aurea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección del material vegetal

Las hojas de *Chuquiraga aurea* Skottsb. (Asteraceae) fueron colectadas en la zona de Comodoro Rivadavia, provincia de Chubut, Argentina, en el período estival. El material fue secado a temperatura ambiente y bajo techo; seleccionado y clasificado, reducido a polvo en un molinillo de paletas provisto de un tamiz de malla 20 y pesado. La planta fue identificada y clasificada taxonómicamente; un ejemplar fue depositado en el Herbario Regional Patagónico bajo el código HRP N° 5796 (Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco).

Preparación de los extractos y caracterización de constituyentes

Las hojas secas reducidas a polvo fueron sometidas a una extracción exhaustiva y consecutiva con etanol acuoso al 85 y al 50 %. A continuación,

el extracto crudo se fraccionó por partición con solventes de polaridad creciente (benceno, cloroformo, éter etílico y acetato de etilo) (Figura 1). La identificación de los grupos químicos principales en el extracto y sus fracciones, se realizó mediante el empleo de reacciones cualitativas usuales (Rondina y Coussio, 1969; Harborne, 1991).

El extracto y sus fracciones fueron analizadas también mediante cromatografía planar sobre papel Whatman N° 1 empleando como fases móviles BAW (*n*-butanol-ácido acético-agua, 3:1:1) y ácido acético al 15 %.

Los principales productos evidenciados se obtuvieron mediante cromatografía preparativa empleando papel Whatman N° 3 MN y BAW como fase móvil. A continuación fueron analizados mediante espectrofotometría obteniendo los correspondientes espectros de absorción al UV-Vis. Los resultados se compararon con estándares y con bibliografía (Mabry et al., 1970).

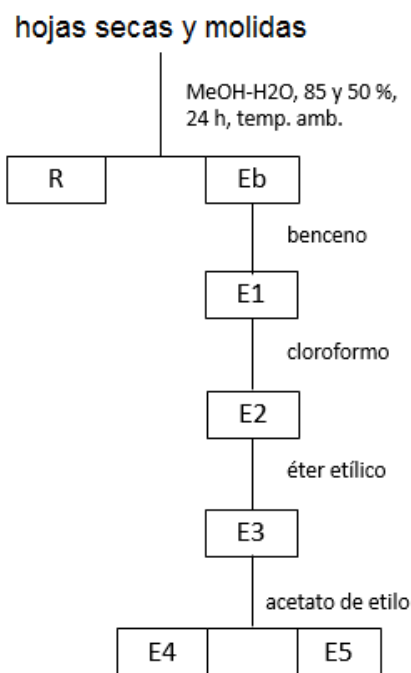


Figura 1. Extracción de las hojas de *Chuquiraga aurea* (Asteraceae). R: residuo o marco; Eb: etanol (crudo); E1: benceno; E2: cloroformo; E3: éter etílico; E4: acetato de etilo; E5: fracción acuosa final.

Figure 1. Extraction of the leaves of *Chuquiraga aurea* (Asteraceae). R: residue or marc; Eb: ethanol (crude); E1: benzene; E2: chloroform; E3: ethyl ether; E4: ethyl acetate; E5: final aqueous fraction.

Estudios de actividad biológica

1. Bioensayo de citotoxicidad de la *Artemia salina*.

Se utilizó el test descrito por McLaughlin et al. (1993). Los huevos de *Artemia salina* se incubaron en agua de mar artificial (3,8 g de sal marina por cada 100 ml de agua destilada) a temperatura ambiente, en presencia de luz artificial. Luego de 48 h, los nauplios fueron colocados (10 por tubo) en diluciones de 10, 100 y 1000 µg/ml de cada muestra a ensayar (por triplicado) y mantenidos durante 24 h en idénticas condiciones. Al cabo de este tiempo se contaron los nauplios sobrevivientes y se determinó la DL₅₀

mediante el programa propuesto por Finney (1978).

2. Determinación de la actividad antitumoral.

Se utilizó el ensayo de inhibición de la elongación de las raíces de trigo empleando semillas de *Triticum sativum* var. Klein pegaso (Desmarchelier et al., 1995).

3. Ensayo del Metil Green-ADN.

Se empleó la técnica descrita por Burress et al. (1992). Todos los extractos se analizaron mediante el ensayo de intercalación en el ADN en concentraciones finales de 1000, 100 y 10 µg/ml en etanol absoluto. Para tal fin se suspendieron 20 mg de MG-ADN en

100 ml de Tris-HCl 0,05 M, pH= 7,5, conteniendo 7,5 mM de sulfato de magnesio, y se agitó a 37 °C durante 24 h. A continuación se agregaron 400 µl del reactivo MG-ADN. Como compuesto de referencia, se utilizó clorhidrato de doxorubicina.

4. Actividad antibacteriana.

Para el estudio se prepararon soluciones de cada extracto de concentración final de 250 µg/ml, utilizando como solvente etanol al 70 %. Las cepas utilizadas fueron: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) y *Escherichia coli* (ATCC 25922). Se empleó el medio de cultivo Antibiotico N° 1, como control negativo etanol al 70 % y como control positivo estreptomycin con una concentración de 10 mg/ml. El método usado fue el de difusión en ágar (Martínez et al., 1997).

5. Determinación de actividad antioxidante.

Se utilizó el método de inhibición del DPPH (radical 2,2-difenil-1-

picrilhidracilo), descrito por Koleva et al. (2002), y se determinó la SC₅₀ utilizando la técnica propuesta por Choi et al. (2002), la cual determina la concentración de muestra necesaria para atrapar el 50 % de los radicales libres del DPPH.

RESULTADOS Y DISCUSION

A fin de determinar los principales grupos de metabolitos presentes en las hojas de *Chuquiraga aurea*, se realizó un screening químico cualitativo. La Tabla 1 presenta los resultados obtenidos.

El screening evidenció fundamentalmente la presencia de flavonoides, taninos, hidratos de carbono, triterpenos y esteroides. Otros autores describieron también en otras especies de *Chuquiraga* además de flavonoides, constituyentes tales como triterpenos (Hoeneisen et al., 2000; Ccana-Ccapatinta et al., 2017) y saponinas en un extracto alcohólico de *C. spinosa* (Arroyo-Acevedo et al., 2018).

Tabla I. Composición química del extracto y las fracciones de las hojas de *Chuquiraga aurea* (Asteraceae).

Table I. Chemical composition of the extracts and the fractions of the leaves of *Chuquiraga aurea* (Asteraceae).

Muestra ^a	Grupo químico ^b
Eb	F, H, E, Tr
E1	H, T, E
E2	F, H, T, Tr
E3	F, H, T, Tr
E4	F*, H, T, Tr
E5	F, H, T, Tr

^aEb: etanol (crudo); E1: benceno; E2: cloroformo; E3: éter etílico; E4: acetato de etilo; E5: fracción acuosa final. ^bF: flavonoides; H: hidratos de carbono; T: taninos; E: esteroides; Tr: triterpenos. *: muy abundante.

^aEb: ethanol (crude); benzene; E2: chloroform; E3: ethyl ether; E4: ethyl acetate; E5: final aqueous fraction. ^bF: flavonoids; H: carbohydrates; T: tannins; E: steroids; Tr: triterpenes. *: most abundant.

En cuanto a los flavonoides, mediante cromatografía planar se pudo determinar que los principales correspondían a flavonoles y flavonas. Los espectros de absorción obtenidos al UV-Vis mostraron la presencia de kaempferol, quercetina y glicósidos de

ambos, así como flavonas metoxiladas. Con respecto a estas últimas, se pudo inferir la posible presencia de 4'-metoxiflavona ($\lambda_{\text{máx}}$ 252, 318 nm) y de 3,5,6,7,8-pentametoxiflavona ($\lambda_{\text{máx}}$ 234, 280h, 330h nm; Figura 2).

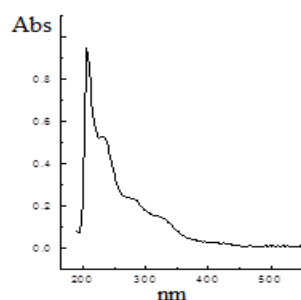


Figura 2. Espectro al UV-Vis de la 3,5,6,7,8-pentametoxiflavona obtenida de las hojas de *Chuquiraga aurea* (Asteraceae).

Figure 2. UV-Vis spectrum of the 3,5,6,7,8-pentamethoxyflavone obtained of the leaves of *Chuquiraga aurea* (Asteraceae).

Ccana-Ccapatinta et al. (2017) describieron que el perfil fitoquímico de la subfamilia Barnadesioideae está constituido fundamentalmente por compuestos fenólicos simples, flavonoides y triterpenoides. Mendiondo et al. (2000) analizaron los flavonoides de especies de *Chuquiraga* de Argentina destacando la presencia de derivados de quercetina y kaempferol por ej. en *C. erinacea*. En cuanto a flavonas y derivados metoxilados, Ramírez et al. (2014) determinaron la presencia de 5,6,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona en extractos clorofórmicos de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”, especie de importancia por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias e inmunomoduladoras. Respecto de la importancia medicinal del género, se ha descrito el uso frecuente de *Chuquiraga jussieui* y *C.*

spinosa en el tratamiento del cáncer de próstata (Ccana-Ccapatinta et al., 2017). Otros autores también mencionaron actividad sobre diferentes líneas celulares tumorales de *Chuquiraga spinosa* (Arroyo-Acevedo et al., 2018; Herrera-Calderón et al., 2017; Madaleno, 2012). En nuestro trabajo, a fin de evaluar el extracto y las fracciones de *C. aurea* como posibles fuentes de moléculas bioactivas, se llevaron a cabo diversos bioensayos. Para investigar la citotoxicidad que se correlaciona con actividad antitumoral, se utilizaron los bioensayos de mortalidad de la *Artemia salina* y de inhibición del crecimiento de raíces de trigo.

En la **Tabla II** se muestran los resultados de DL₅₀ y % de nauplios muertos obtenidos al analizar el extracto y las fracciones de las hojas de *C. aurea* mediante el bioensayo de la *Artemia*

salina. Como puede observarse, la citotoxicidad fue muy importante con una $DL_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$, destacándose la fracción de acetato de etilo (E4) que evidenció una DL_{50} de $1 \mu\text{g/ml}$ y la acuosa final con una DL_{50} de $20 \mu\text{g/ml}$. Estudios efectuados con extractos acuosos de *C. spinosa* y *C. weberbaueri*

mostraron una $DL_{50} > 10000 \mu\text{g/ml}$ frente al ensayo de la *Artemia salina*; en cambio los extractos etanólicos evidenciaron una DL_{50} de 1,1 y $0,25 \mu\text{g/ml}$, respectivamente (Bussmann et al., 2011).

Tabla II. Citotoxicidad del extracto y las fracciones de las hojas de *Chuquiraga aurea* (Asteraceae).
Table II. Cytotoxicity of the extract and the fractions of the leaves of *Chuquiraga aurea* (Asteraceae).

Muestra ^a	DE ₅₀ (μg/ml)	% nauplios muertos		
		10 (μg/ml)	100 (μg/ml)	1000 (μg/ml)
Eb	749	20	40	52
E1	85	27	43	67
E2	67	23	63	77
E3	90	23	47	83
E4	1	21	67	90
E5	20	43	67	93

^aEb: etanol (crudo); E1: benceno; E2: cloroformo; E3: éter etílico; E4: acetato de etilo; E5: acuoso.

^aEb: ethanol (crude); benzene; E2: chloroform; E3: ethyl ether; E4: ethyl acetate; E5: final aqueous fraction.

El ensayo de inhibición del crecimiento radicular, constituye otro bioensayo de citotoxicidad, cuyos resultados positivos presumen una actividad antitumoral. Este ensayo requiere que las muestras sean solubles en agua corriente, por ello se seleccionó a la fracción acuosa final (E5) del extracto para analizar esta actividad. Esta fracción mostró un efecto inhibitorio moderado del

desarrollo radicular, correspondiente al 30 %.

A partir de los resultados obtenidos, se realizó el ensayo del Metil Green-ADN con el objetivo de comprobar si la citotoxicidad observada era debida al menos en parte, a la presencia de compuestos que se intercalan en el ADN. Este ensayo se llevó a cabo en el extracto crudo y en todas sus fracciones.

Como se observa en la Tabla III, el extracto etanólico (Eb) produjo una disminución del 20 % de la absorbancia inicial del complejo MG-ADN, la

fracción de cloroformo (E2), un 30 %, mientras que la fracción acuosa final (E5) fue la más destacada, con un 50 %.

Tabla III. Ensayo del Metil Green-ADN del extracto y las fracciones de las hojas de *Chuquiraga aurea* (Asteraceae).

Table III. Assay of Methyl Green-DNA of the extract and the fractions of the leaves of *Chuquiraga aurea* (Asteraceae).

Muestra ^a	MG-DNA % de inhibición
Eb	20
E1	<20
E2	30
E3	<20
E4	<20
E5	50

^aEb: etanol (crudo); E1: benceno; E2: cloroformo; E3: éter etílico; E4: acetato de etilo; E5: acuoso.

^aEb: ethanol (crude); benzene; E2: chloroform; E3: ethyl ether; E4: ethyl acetate; E5: final aqueous fraction.

Los resultados obtenidos sugieren que la citotoxicidad de la *Artemia salina* y la inhibición del crecimiento radicular podría ser explicada, al menos en parte, como el resultado de la presencia de compuestos de polaridad importante que podrían intercalarse en el ADN. Los flavonoides y otros compuestos fenólicos son conocidos por poseer efectos antitumorales (Gioti and Tenta, 2015; Yang et al., 2015). Como se observa en las Tablas II y III, en nuestro estudio las

fracciones con mayor bioactividad fueron los de mayor polaridad los que demostraron estar enriquecidos en flavonoides e hidratos de carbono.

Uno de los usos más populares de distintas especies de *Chuquiraga* es en el tratamiento de enfermedades infecciosas del tracto urinario. Extractos alcohólicos de *C. atacamensis*, *C. spinosa* y *C. atraminea* presentaron actividad antibacteriana y antifúngica sobre cepas seleccionadas que podrían sustentar sus usos tradicionales en

infecciones genitourinarias (Ccana-Capatinta et al., 2017). En base a los antecedentes existentes, evaluamos la actividad antibacteriana del extracto etanólico y sus fracciones de las hojas de *C. aurea*. Sin embargo, ninguna de las muestras ensayadas demostró actividad antibacteriana frente a las cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) empleadas en el análisis.

Otros autores (Casado et al., 2011; Mendiondo et al., 2011; Dueñas et al., 2014; Ramírez et al., 2014), han demostrado la actividad antioxidante de

diversas especies de *Chuquiraga*. Considerando tales antecedentes y los resultados que obtuvimos de la caracterización química del extracto y sus fracciones, evaluamos la actividad antioxidante a través del ensayo de inhibición del DPPH y la determinación de la SC50 de la fracción acuosa final (E5) del extracto de *Chuquiraga aurea*. El resultado fue interesante, evidenciando un 57,8 % de inhibición del DPPH y una SC50 de 117,6 µg/ml (Tabla IV). Esto podría ser explicado al menos en parte, por la presencia de flavonoles derivados de la quercetina y el kaempferol, así como otros fenoles simples.

Tabla IV. Actividad antioxidante de la fracción acuosa final del extracto de las hojas de *Chuquiraga aurea* (Asteraceae).

Table IV. Antioxidant activity of the final aqueous fraction of the extract of the leaves of *Chuquiraga aurea* (Asteraceae).

Muestra	Act. Antioxidante % de inhibición de DPPH	Act. Antioxidante SC ₅₀ (µg/ml)
E5	57,8	117,6

CONCLUSIONES

Este trabajo comprende los primeros resultados sobre la composición química y la bioactividad de *Chuquiraga aurea*. Los flavonoides caracterizados se relacionan con las

actividades biológicas, permitiendo sugerir la potencialidad de la especie como antitumoral.

En su conjunto, los resultados alcanzados constituyen un aporte novedoso al conocimiento

farmacognóstico de la especie y contribuyen a la quimiotaxonomía dentro de las Asteraceae. A la vez, guardan relación con las propiedades medicinales tradicionales descriptas para la especie y para el género.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo forma parte de proyectos de investigación subsidiados por PNUD ARG 02/018, FONCYT (PICTO GSJ 36871, PME 2015) y PI UNPSJB 1405. Los autores forman parte de la Carrera de Doctorado en Farmacia que integra la COIFFA.

BIBLIOGRAFÍA

- Arroyo-Acevedo, J.; Herrera-Calderón, O.; Rojas-Armas, J.; Chumpitaz-Cerrate, V.; Franco-Quino, C.; Hañari-Quispe, R. *Chuquiraga spinosa* Lessing: A Medicinal Plant for Gastric Cancer Induced By N-Methyl-N-Nitroso-Urea (NMU). *Pharmacog J.* **2018**, 10: 20-24.
- Burress, N.; Frigo, A.; Rasmussen, R.; McAlpine, J. A colorimetric microassay for the detection of agents. *J. Nat. Prod.* **1992**, 55: 1582-1587.
- Bussmann, R.W.; Malca, G.; Glenn, A. et al. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, 137: 121-140.
- Casado, R.; Landa, A.; Calvo, J.; García-Mina, J.M.; Marston, A.; Hostettmann, K., Calvo MI. Anti-inflammatory, antioxidant and antifungal activity of *Chuquiraga spinosa*. *Pharm Biol.* **2011**, 49: 620-626.
- Ccana-Ccpatinta, G.; Monge, M.; Ferreira, P.; Da Costa, F. Chemistry and medicinal uses of the subfamily Barnadesioideae (Asteraceae). *Phytochem. Rev.* **2017**, <http://doi.org/10.1007/511101-017-9544-y>
- Desmarchelier, C.; Mongelli, E.; Coussio, J.; Giuletti, A.; Ciccía, G. Etnobotánica y bioactividad de plantas medicinales utilizadas por un grupo indígena *Takana* de la Amazonia peruana. *Acta Farm. Bonaer.* **1995**, 14: 195-208.
- Dueñas, A.A.; Alcivar, U.E.; Olazabal, E.; Cortes, R. Efecto antioxidante de la *Chuquiraga jussieui* en el ensayo de hemólisis. *Medicent Electron.* **2014**, 18: 57-64.
- Ezcurra, C. Revisión del Género *Chuquiraga* (Compositae- Mutisieae). *Darwiniana.* **1985**, 26: 219-284.
- Finney, D.J. *Statistical method in biological assay*. Londres, Gran Bretaña, 1978.
- Gioti, K.; Tenta, R. Bioactive natural products against prostate cancer: mechanism of action and autophagic/apoptotic molecular pathways. *Planta Med.* **2015**, 81: 543-562.
- Herrera-Calderon, O.; Tinco-Jayo, J.A.; Franco-Quino, C. Antioxidant activity and cytotoxic profile of *Chuquiraga spinosa* Lessing on human tumor cell lines: a promissory plant from Peruvian flora. *Asian Pac J Trop Dis.* **2017**, 7: 304-308.
- Hoeneisen, M.; Rojas, A.; Bittner, M.; Becerra, J.; Silva, M.; Jakupovic, J. Constituents of *Chuquiraga atacamensis* and *C. ulicina*. *Bol. Soc. Chil. Quím.* **2000**, 45: 49-52.
- Koleva, I.I.; Van Beek, T.A.; Linssen, J.P.H.; Groot, A.; Evstatleva, L. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a

- Comparative Study o Three Testing Methods. *Phytochem. Anal.* **2002**, 13: 8-17.
- Mabry, T.J.; Markham, K.R.; Thomas, M.B. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag, Nueva York, 1970.
- Madaleno, I.M. Organic cultivation and use of medicinal plants in Latin America. *Pharmacogn Commn.* **2012**, 2: 34–51.
- Martínez, M.J.; Molina, N.; Boucourt, E. Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (Guayaba). *Rev. Cubana Plants Med.* **1997**, 2: 12-14.
- McLaughlin, J.L.; Chang, C.J.; Smith, D.L. Simple bench-top assays (brine shrimp and potato discs) for the discovery of plant antitumor compounds. Review of recent progress. *ACS Symp. Ser.* **1993**, 534: 112-134.
- Mendiondo, M.E.; Juárez, B.E.; Seeligmann, P. Flavonoids profiles of some Argentine species of *Chuquiraga* (Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **2000**, 28: 283-285.
- Ramírez, E.; Bonilla, P.; Suarez, P.; Fritz Choquesillo, F.; Castro, A. Actividad antioxidante, antioxidante e inmunomoduladora del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “Huamanpinta”. *Ciencia e Investigación* **2014**, 17: 37-42.
- Rondina, R.V.V.; Coussio, J.D. Estudio fotoquímico de plantas medicinales Argentinas (1). *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, INTA, serie 2, Biología y Producción Vegetal **1969**, 22: 351-366.
- Tropicos database (www.tropicos.org).
- Yang, F.; Song, L.; Wang, H.; Wang, J.; Xu, Z.; Xing, N. Quercetin in prostate cancer: chemotherapeutic and chemopreventive effects, mechanisms and clinical application potential. *Oncol Rep.* **2015**, 33: 2659–2668.

Tesis de Maestría

Plantas de la estepa patagónica tolerantes a la contaminación de derivados del petróleo

Patagonian steppe plants tolerant to oil derivative contamination

Tesista: Vivien Pentreath

Director: Dr. Fernando Pliego Alfaro, **Co-directora:** Mag. Susana G. Perales

IV Maestría en Biotecnología de Plantas. Universidad Internacional de Andalucía -UNIA-. Huelva. España. Fecha de aprobación 26 de Setiembre de 2012. 92 páginas.

RESUMEN

El petróleo es una de las principales fuentes de energía en la actualidad, su explotación genera diversos niveles de contaminación ocasionados por su liberación accidental o intencionada en el ambiente.

Independientemente de los síntomas evidentes (color, olor, sabor), el medio receptor experimenta efectos que perturban su equilibrio y tienen una acción directa sobre los seres vivos; modificación de las propiedades físicas tales como la tensión superficial, el pH, la temperatura, el potencial de óxido reducción; la precipitación de elementos minerales (nitrógeno, fósforo, hormonas, oligo-elementos, vitaminas, etc.) indispensables para la vida de los microorganismos. Basados en la observación, se planteó la hipótesis de que hay plantas nativas de la estepa tolerantes al petróleo, porque logran desarrollarse en suelos con este componente. En el presente trabajo se

propuso i) Determinar el rango de resistencia de *Atriplex lampa* y *Prosopis denudans* a hidrocarburos de petróleo; ii) Evaluar *in vitro* la influencia de hidrocarburos de petróleo sobre parámetros morfológicos (longitud de tallo, longitud de raíz, número de hojas) y bioquímicos (contenido de clorofila) de plantas de la estepa patagónica y iii) Establecer las condiciones óptimas de regeneración de planta completa *in vitro*, de *A. lampa* y *P. denudans*.

Para evaluar la toxicidad del petróleo se tomaron 28 muestras de suelo en un yacimiento y dos muestras de las biopilas (apilamiento de suelo contaminado en el que se estimula la actividad microbiana por adición de nutrientes y humedad). Se secaron al aire, se disgregaron y tamizaron. Se determinó pH y conductividad eléctrica (EC), capacidad de retención de agua (% SA) e Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP). Para los análisis de fitotoxicidad del suelo del yacimiento se realizó la

prueba de Inhibición de la germinación y elongación de raíz e hipocótilo con lechuga (*Lactuca sativa* L.) (Castillo Morales *et al.*, 2004) y se repitió el ensayo con semillas de especies nativas de la estepa patagónica (N:20 x 3

repeticiones). Se obtuvo el ¹IG (Índice de Germinación) que integra el % relativo de germinación ²) (PGR) y el crecimiento relativo de las raíces ³) (CRR) (Varnero *et al.*, 2007).

$$1) IG = \frac{PGR \times CRR}{100} \quad 2) PGR = \frac{N^{\circ} \text{ semillas germinadas en muestra}}{N^{\circ} \text{ semillas germinadas en testigo}} \times 100$$

$$3) CRR = \frac{\text{elongación de radículas en muestra}}{\text{elongación de radículas en testigo}} \times 100$$

A fin de encontrar la CI₅₀ (Concentración que Inhibe el 50% de la germinación) de petróleo, se realizó el ensayo de Inhibición de la germinación y elongación de raíz e hipocótilo con lechuga en diluciones de petróleo crudo del mismo yacimiento: 40; 20; 10; 5 y 2,5 % p/p, en 25 gr de arena lavada y esterilizada en estufa a 500 °C. Se repitió el ensayo con especies nativas de la estepa patagónica (N:20 x 3 repeticiones) y se utilizó para su cálculo el modelo de respuesta PROBIT 1,5 (US EPA, 1994). Con el fin de controlar la sensibilidad de las semillas se realizó un control positivo utilizando una sal de Zn (II) como tóxico de referencia. Se obtuvo el Índice de Germinación (IG), la tasa de germinación, utilizando la ⁴Tasa de Maguire -M- (Naylor, 1981), para determinar si hubo retraso en la velocidad del proceso. Los resultados se analizaron estadísticamente para obtener

el valor NOEC (concentración a la cual no se observó efecto adverso).

$$4) M = \frac{n_1}{t_1} + \frac{n_2}{t_2} + \dots + n_x/t_x$$

dónde n₁, n₂, n_x es el n° de semillas germinadas en el tiempo t₁, t₂, t_x (en días). Para analizar el desarrollo de las plantas se evaluó su comportamiento *in vitro* en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) conteniendo la Fracción Soluble de Petróleo (FSP) obtenida a partir de la mezcla de agua con petróleo, en una concentración de 1000 ppm y pH 5,8 (N:20 x 3 repeticiones); en cámara de cultivo a una temperatura 21 °C ±1; fotoperíodo de 16 hs y una intensidad lumínica de 120 mE cm⁻² s⁻¹. A los 30 días de cultivo se evaluó la supervivencia de las plantas, longitud de tallo, número de hojas, largo de raíz, biomasa aérea y radicular (peso seco en estufa a 68 °C) y cantidad de clorofila a y b y clorofila total. Se registraron caracteres

morfológicos anormales, en comparación con el testigo. Se realizó el cálculo del Índice Relativo de Fitotoxicidad (IRF) (Rivera Cruz & Trujillo Narcía, 2004) como referencia para medir los efectos del contaminante ($IRF = \frac{\text{Tratamiento testigo}}{\text{Tratamiento con contaminante}}$). El desarrollo temprano de las plantas es evaluó en suelo conteniendo HTP 1 y 5% p/p. Las plantas (N:10 x 3 repeticiones) se mantuvieron en invernadero a 23 °C, con fotoperiodo estacional de 10 hs luz (otoño-invierno). La humedad de los envases se mantuvo a capacidad de campo. A los 60 días se midieron los mismos parámetros que en cultivo con FSP. Se registraron caracteres morfológicos anormales en comparación con el testigo, que se mantuvo en el mismo medio de cultivo, pero sin derivados del petróleo y se calculó el IRF. Se obtuvieron 120 explantos, a partir de semilla, para proceder a su cultivo *in vitro* y regeneración de planta completa. Cuando las plantas desarrollaron unos cuatro o cinco

entrenados, se cortaron esquejes uninodales que se sembraron en medio MS con 100% de sales, sin reguladores de crecimiento (N: 20 x 3 repeticiones). Se realizaron tres cultivos sucesivos y se evaluó la regeneración de planta completa a los 30 días, en cada subcultivo se midió la longitud de tallo y de raíz.

Los valores de HTP medidos en el testigo del yacimiento fueron menores de 10 mg kg⁻¹ de Masa Seca (MS) y en las áreas afectadas por contaminación oscilaron entre 142,7 y 175.429,5 mg kg⁻¹ MS (Tabla I). Del ensayo de fitotoxicidad aguda en suelos contaminados, se obtuvieron valores IG que se reúnen en tres categorías: Severa, Moderada y Leve. En la categoría Severa (los valores de $IG \leq 50\%$ indicarían que hay una fuerte presencia de sustancias fitotóxicas) encontramos cinco muestras para *L. sativa*, tres para *A. lampa* y una para *P. denudans*. Los valores entre 50 y 80% representan presencia Moderada de estas sustancias y Leve si $IG \geq 80\%$ (Figura 1).

Tabla I. Contenido de HTP en muestras de suelo del yacimiento.
Table I. HTP content in soil samples from the reservoir.

Muestras suelo	HTP mg.kg ⁻¹ MS
Testigo	< 10
13	100-1000
4	1001-10000
13	> 10001

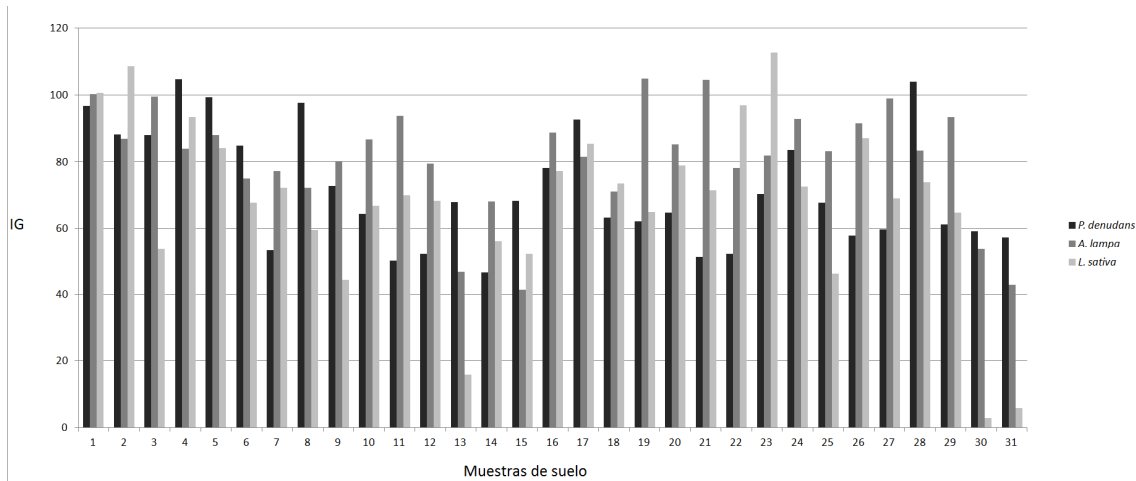


Figura 1. Índice de Germinación de *P. denudans*, *A. lampa* y *L. sativa* en muestras de suelo de un yacimiento petrolero. La línea gruesa marca el IG50, límite de fitotoxicidad severa. Muestra 1: testigo, Muestras 30 y 31: Biopilas.

Figure 1. Germination index of *P. denudans*, *A. lampa* and *L. sativa* in soil samples from an oil field. The thick line marks the IG50, limit of severe phytotoxicity. Sample 1: witness, Samples 30 and 31: Biopiles

La germinación de plantas nativas fue más resistente a la presencia de HTP que el bioindicador de referencia (Tabla II). La CL₅₀ de *A. lampa* fue de 32,9 % HTP

(p/p) y en el caso de *P. denudans* no se encontró ni en 100 % HTP (p/p), mientras que para *L. sativa* fue de 2,3 %HTP (Tabla III).

Tabla II. Ensayo de germinación con concentraciones crecientes de HTP. Letras iguales indican que los valores no presentan diferencias estadísticas significativas.

Table II. Germination test with increasing concentrations of HTP. Equal letters indicate that the values do not show significant statistical differences.

HTP (%p/p)	Germinación %			Tasa Germinación		
	<i>L. sativa</i>	<i>A. lampa</i>	<i>P. denudans</i>	<i>L. sativa</i>	<i>A. lampa</i>	<i>P. denudans</i>
Testigo	86,6 ±2,8 a	95 ±2,9 a	96,7 ±5,8 a	7,7 ±0,5 a	13,02 ±0,08 a	11,4 ±3,2 a
2,5	45 ±5 b	96,6 ±8,6 a	95 ±0 a	3,4 ±0,13 ab	8,6 ±0,4 a	7,7 ±2,1 ab
5	35 ±5 b	98,3 ±2,9 a	96,6 ±2,9 a	2,3 ±0,6 b	8,3 ±0,2 a	8,9 ±2,2 ab
10	50 ±5 b	96,6 ±5,7 a	96,6 ±2,9 a	3,5 ±0,9 ab	9,3 ±0,2 a	9,7 ±1,3 ab
20	43,3 ±14,4 b	90 ±0 a	91,6 ±10,4 a	3,97 ±0,9 ab	8,6 ±0,2 a	10 ±3,7 a
40	13,3 ±2,9 b	26,6 ±15,2 b	65 ±8,6 b	0,55 ±0,08 b	1,3 ±0,8 b	5,2 ±1,9 b

Tabla III. Concentración que Inhibe el 50% de la germinación.

Table III. Concentration that inhibits 50% of germination.

CI ₅₀ de HTP	HTP % p/p	ZnSO ₄ % p/p
<i>L. sativa</i>	2,3	2,01
<i>A. lampa</i>	32,9	8,27
<i>P. denudans</i>	> 100	7,53

Para las especies nativas el valor de fitotoxicidad en el proceso de germinación se situó a partir del 40 % HTP (p/p) y el valor NOEC para fue de 20 % HTP (p/p), por lo cual se podrían considerar tolerantes a HTP durante el proceso de germinación. Las Fracciones Solubles de Petróleo resultaron levemente fitotóxicas durante el crecimiento temprano de las plantas. Los indicadores más afectados de *A. lampa* fueron la biomasa y contenido de clorofila total. En el caso de *P. denudans* los IRF fueron mayores que en *A. lampa*, afectando a todas las variables medidas. En los cultivos realizados en suelo conteniendo HTP, *A. lampa* no sobrevivió. En *P. denudans* la concentración de 1 % HTP (p/p) tuvo menor efecto fitotóxico que la concentración de 5 % HTP (p/p). En ésta última la toxicidad del contaminante afectó principalmente a la parte aérea (longitud de tallo, nº de nudos y clorofila total). Es importante remarcar la

supervivencia de ésta especie en suelos conteniendo 1 % HTP (p/p) debido a que la legislación de la Provincia del Chubut (Dec. 993/2007) aceptaba ese valor como límite máximo de contenido de petróleo en suelo. Mediante el cultivo *in vitro* se logró regenerar planta completa, sin la utilización de reguladores de crecimiento, durante tres cultivos sucesivos. En *A. lampa* la regeneración de planta completa varió entre 38 y 54,3 %; *P. denudans* presentó valores que oscilaron entre 12,9 y 20,3%. Durante el cultivo en condiciones de campo, de las plantas regeneradas *in vitro*, no se observaron diferencias en el desarrollo, logrando obtener plantas adultas de sanidad controlada de *Atriplex lampa* y *Prosopis denudans*. El conjunto de las observaciones realizadas en los ensayos con petróleo indicaron que estas especies pueden ser utilizadas en procesos de recuperación de áreas alteradas por la actividad petrolera.

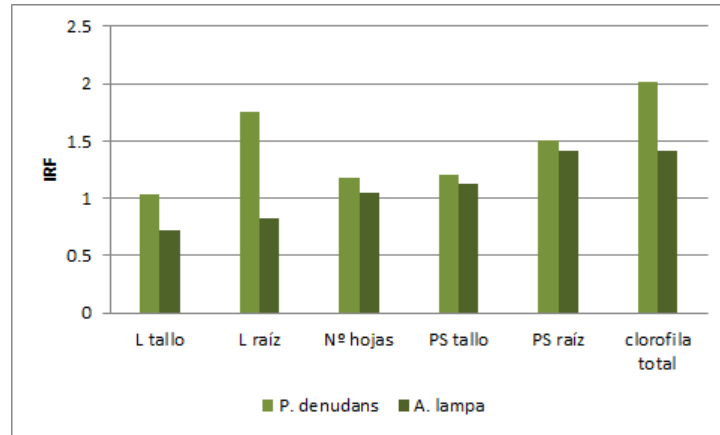


Figura 2. Índice Relativo de Fitotoxicidad de *A. lampa* y *P. denudans* en cultivo con FSP. La línea gruesa marca el límite de fitotoxicidad.

Figure 2. Relative Phytotoxicity Index of *A. lampa* and *P. denudans* in culture with FSP. The thick line marks the limit of phytotoxicity.

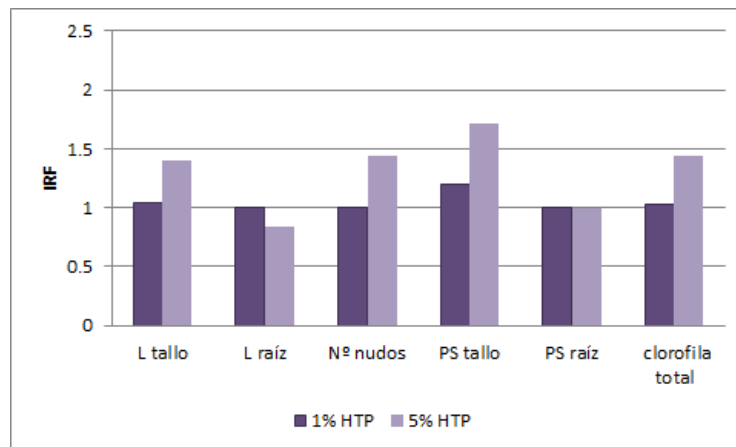


Figura 3. Índice Relativo de Fitotoxicidad de *P. denudans* en suelo con FSP. La línea gruesa marca el límite de fitotoxicidad.

Figure 3. Relative Index of Phytotoxicity of *P. denudans* in soil with FSP. The thick line marks the limit of phytotoxicity.

PALABRAS CLAVE: *Atriplex lampa*, Ecotoxicología, Petróleo, *Prosopis denudans*, Test de lechuga.

PUBLICACIONES:

Capítulo de Libro: Pentreath, V y Perales, S. 2013. Comportamiento de *Atriplex lampa* (Quenopodiaceae) y *Prosopis denudans* (Fabaceae) en sustratos con petróleo- Pérez, D.R.; Rovere, A.E. & Rodríguez Araujo, M.E. Restauración Ecológica en la Diagonal

Árida de Argentina. Vázquez Mazzini Ed. 344-350 pag. ISBN: 978-987-9132-40-1. 520 pp.

Pentreath, V.; González, E.; Barquín, M.; Ríos, S.M. y Perales, S. 2015. Bioensayo de toxicidad aguda con plantas nativas para evaluar un derrame de petróleo. Revista de Salud Ambiental 15(1): 4-12.

Capítulo de Libro: Pentreath, V.; Fernández, S.; González, E. y Perales, S. 2015. *Atriplex lampa* (Quenopodiaceae): Especie valiosa para la recuperación de áreas degradadas por la explotación petrolera. Restauración Ecológica

en la Diagonal Árida de Argentina 2. 1ra Edición. E. Martínez Carretero y A. D. Dalmasso Editores. ISBN 978-987-33-7114-1. 483pp.

BIBLIOGRAFIA

Castillo Morales, Gabriela (ed.). Díaz Báez, M.C.; Pica Granados, Y.; Ronco, A.; Sobrero, C.; Bulus Rossin, G.; Feota, G.; Forget, G. & Sánchez-Bain, A. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. México: IMTA. 189pp.

Murashige, T. & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture. *Physiología Plantarum*, 15: 473-497.

Naylor, R.E.L. 1981. An evaluation of various germination indices for predicting differences in seed vigour in Italian ryegrass. *Seed Sci. & Technol.* 9: 593-600.

Rivera Cruz, M.C; Trujillo Narcía, A.; Miranda de la Cruz, M.A. & Maldonado Chávez, E. 2005. Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleo nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas. *Interciencia*. Vol 30. N° 6. 326-331.

USEPA. 1994. User's guide: Probit Program versión 1.5. U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). Ecological Monitoring Research Division, Cincinnati, Ohio, USA.

Varnero M, M.T; Rojas A, C. & Orellana R, R. 2007. Índices de fitotoxicidad en residuos orgánicos durante el compostaje. *J. Soil Sc. Nutr.* 7 (1): 28-37.