

Estudios anatómicos y análisis fitoquímicos preliminares de Monocotiledóneas hidrófitas en “mallines” de la estepa patagónica

Elizabeth A. Barrientos*, Mabel S. Feijóo, Roxana B. Peneff, Evangelina Laztra,
Adriana C. Gratti

Facultad Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Km 4. (9000) Comodoro Rivadavia, Chubut, República Argentina.

*Autor a quien dirigir la correspondencia: elizaba@unpata.edu.ar

Resumen

Los “mallines”, alumbramientos de agua, constituyen el principal recurso productivo de la Patagonia árida. En este trabajo se describen las características anatómicas y fitoquímicas de las especies más abundantes: *Eleocharis pseudoalbibracteata* S. González & Guagl. (Cyperaceae), con status de endémica; *Juncus balticus* Willd. subsp. *mexicanus* (Willd. ex Roem. & Schult.) Snogerup (Juncaceae), ambas forrajeras de alta calidad; y *Schoenoplectus californicus* (C. A. Mey.) Soják var. *californicus* (Cyperaceae), especie nativa no forrajera. Los sitios de muestreo se ubican en el Dpto. Escalante, al SE de la provincia de Chubut. Se realizaron estudios anatómicos, sobre material fresco y conservado en FAA, utilizando técnicas tradicionales, registro de imágenes con MO y mediciones con *software* específico. Se caracterizaron parámetros de tamaño, ACE, CMSC y dureza. El *screening* fitoquímico se realizó según técnicas convencionales. Se determinaron diferencias anatómicas con relación a: forma en la sección transversal del tallo aéreo, número de haces vasculares y presencia/ausencia de espacios aeríferos y de esclerénquima subepidérmico. La ausencia de estos caracteres en *J. balticus* es compensada por una abundante médula asteriforme diafragmática y por mayor proporción de fibras vasculares, respectivamente. Las características comunes fueron: la anatomía caulinar C₃, con presencia de dos vainas vasculares, interna de fibras y externa parenquimática, y el clorénquima en empalizada u homogéneo. El CMSC fue significativamente mayor en *J. balticus*. El TC y la dureza en *E. pseudoalbibracteata* fueron significativamente menores. En epidermis de *S. californicus* se detectaron mucílago. Los análisis fitoquímicos evidenciaron la presencia de polifenoles, taninos y flavonoides. En *E. pseudoalbibracteata* no se detectaron cumarinas, mientras que las saponinas solo se detectaron en *J. balticus*. Los resultados del análisis significan un aporte al conocimiento de metabolitos secundarios en las especies de monocotiledóneas evaluadas.

Anatomical Study and Preliminary Phytochemical Analysis of Aquatic Monocots in “Meadows” of the Patagonian Steppe

Summary

The “meadows”, water births, constitute the primary productive resource in arid Patagonia. This work describes the anatomical and phytochemical characteristics of the most abundant species: *Eleocharis*

Palabras clave: Cyperaceae - Juncaceae - Patagonia.

Key words: Cyperaceae - Juncaceae - Patagonia.

pseudoalbibracteata S. González & Guagl. (Cyperaceae), with endemic status; *Juncus balticus* Willd. subsp. *mexicanus* (Willd. ex Roem. & Schult.) Snogerup (Juncaceae), both high quality forage; and *Schoenoplectus californicus* (C. A. Mey.) Var Sojak. *californicus* (Cyperaceae), non-forage native species. The sampling sites are located in the Escalante Department, to the southwest of Chubut Province. Anatomical studies were performed on fresh and FAA preserved material, using traditional techniques, image registration with MO, and measurement with specific software. Parameters of Caulinar Size, Caulinar Specific Area, Caulinar Dry Matter Content, and Hardness were characterized. Phytochemical screening was performed by conventional techniques. Anatomical differences were determined in relation to: shape in cross section of the aerial stem, number of vascular bundles, and presence/absence of air spaces and subepidermic sclerenchyma. The absence of these characters in *J. balticus* is offset by an abundant star shape diaphragmatic pith and higher proportion of vascular fibers, respectively. Common characteristics were: C₃ stem anatomy, with presence of two vascular sheaths, inner of fibers and outer parenchymatic, and palisade or homogeneous chlorenchyma. CDMC was significantly higher in *J. balticus*, CS, and Hardness in *E. pseudoalbibracteata* were significantly lower. Mucilages were detected in *S. californicus* epidermis. Phytochemical analysis showed the presence of polyphenols, tannins, and flavonoids. Coumarins were not detected in *E. pseudoalbibracteata*; while saponins were only detected in *J. balticus*. The results of this analysis constitute a contribution to the knowledge of secondary metabolites in the evaluated monocot species.

Introducción

Los ambientes de mallín constituyen el recurso productivo más importante de la estepa patagónica (Paz y Bufoni, 1986; Cassola, 1988; Solmo y Siffredi, 1993); sobre ellos se desarrollan las principales actividades económicas de la región, la ganadería ovina y la explotación petrolera. El desarrollo de estas actividades promovió cambios en la vegetación, que derivó en la reducción de la cobertura vegetal y, además, el reemplazo de especies, con la intrusión de plantas con mayores defensas físicas y químicas (Bertiller y col., 1995; Bertiller y Bisigato, 1998).

Las características morfológicas vegetales reflejan adaptaciones de las plantas a determinados ambientes. Los grupos de especies que comparten estas características constituyen grupos morfofuncionales.

En relación con los atributos químicos, las plantas presentan una gran diversidad de compuestos secundarios, en respuesta a la imposibilidad de huida frente a las agresiones (Harborne, 1993; Cheeke, 1995). Debido al elevado coste energético que implica su síntesis, las plantas encauzan su metabolismo hacia un tipo u otro de compuesto secundario de acuerdo con los recursos disponibles (Bryant y col., 1992).

El objetivo de este trabajo es realizar la caracterización anatómica y fitoquímica de *Eleocha-*

ris pseudoalbibracteata S. González & Guagl. (Cyperaceae), con estatus de endémica; *Juncus balticus* Willd. subsp. *mexicanus* (Willd. ex Roem. & Schult. f.) Snogerup (Juncaceae), ambas especies forrajeras de alta calidad; y *Schoenoplectus californicus* (C. A. Mey.) Soják var. *californicus* (Cyperaceae), nativa no forrajera. Estas especies registran antecedentes de uso medicinal (Barboza y col., 2009; Lahitte y col., 1998; Verettoni, 1990) y no se registra información sobre estudios químicos. Los sitios de muestreo presentan una cobertura del 100 % y se ubican en cañadones de relieve cóncavo, en el Dpto. Escalante, al SE de la provincia de Chubut (45° 52' 0" S 67° 30' 0" O).

Materiales

Schoenoplectus californicus var. *californicus*: Argentina: Prov. Chubut, Dpto. Escalante, Ea. La Makina, 28-12-09, HRP 7258.

Eleocharis pseudoalbibracteata: Argentina: Prov. Chubut, Dpto. Escalante, Ea. Los Manantiales, 28-12-09, HRP 7261.

Juncus balticus subsp. *mexicanus*: Argentina: Prov. Chubut, Dpto. Escalante, Ea. Los Manantiales, 28-12-09, HRP 7260.

Metodología

Se recolectaron tallos aéreos de cinco individuos de cada especie, seleccionados al azar entre los de tamaño modal. Se realizaron estudios anatómicos y pruebas histoquímicas utilizando técnicas histológicas estandarizadas (D'Ambrogio, 1986; Gattuso y Gattuso, 1999) sobre material fresco y conservado en FAA. Las descripciones se efectuaron mediante el uso de microscopía óptica (MO) y las mediciones con software de medición IM50. Se realizaron análisis cuali y cuantitativos de los caracteres estructurales.

Se caracterizaron parámetros de tamaño, área caulinar específica (ACE), contenido de materia seca caulinar (CMSC) y dureza, como estimación indirecta (Cornelissen y col., 2003; Molina, 2000). Por tratarse de plantas áfilas el área caulinar verdadera fue calculada en sección transversal con MO, dividiendo la circunferencia por 2 y ese valor

multiplicado por el largo del tallo fotosintetizador.

El *screening* fitoquímico se efectuó sobre las partes aéreas desecadas al aire y pulverizadas. El análisis cualitativo de metabolitos secundarios para la detección de polifenoles, taninos, flavonoides, cumarinas, alcaloides, saponinas, antraquinonas, glicósidos cianogenéticos y cardiotónicos y terpenos/esteroides se realizó aplicando técnicas convencionales (de Abreu Matos, 2009). Los datos se analizaron estadísticamente con las funciones incluidas en la planilla de cálculo Excell y se realizó ANOVA con el programa Statistica.

Resultados

Los caracteres anatómicos cualitativos y cuantitativos en transección caulinar de las plantas estudiadas se ilustran y detallan en la figura 1, y en las tablas 1 y 2.

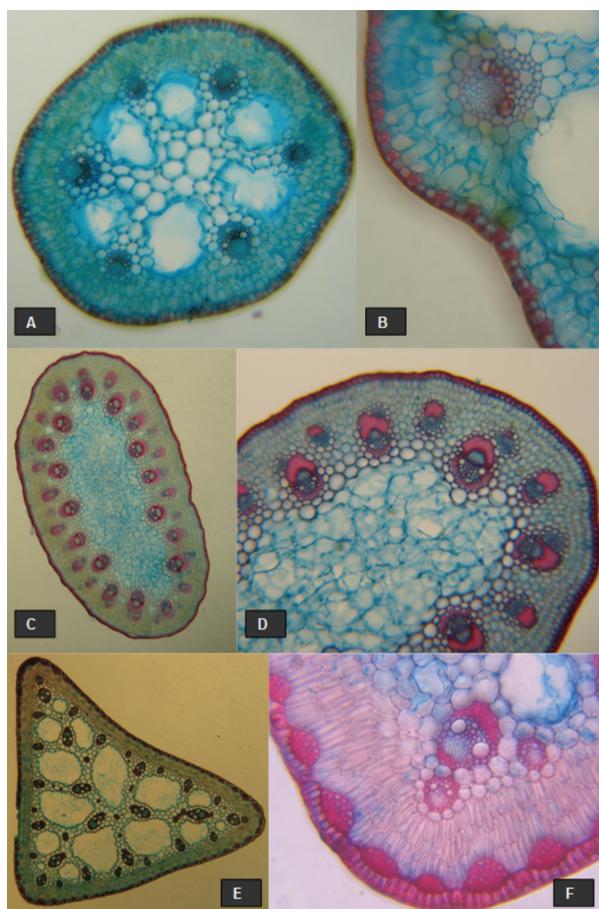
Tabla 1.- Características anatómicas comparadas en corte transversal

Carácter	<i>Schoenoplectus californicus</i> var. <i>californicus</i>	<i>Juncus balticus</i> subsp. <i>mexicanus</i>	<i>Eleocharis</i> <i>pseudoalbibracteata</i>
Forma del tallo	Triangular, trígono a cilíndrico.	Cilíndrico, subcomprimido.	Subcircular irregular o pentagonal.
Epidermis	Cutícula gruesa.	Cutícula intermedia.	Cutícula intermedia.
Cordones de esclerénquima subepidérmico	Forma pulviniforme. Nº de fibras 25-30 (40).	Ausentes.	Forma pentagonal. Nº de fibras 5 - 7.
Clorénquima Nº de estratos	Empalizada radiado. 2 estratos de células alargadas.	Empalizada radiado. 3 estratos de células más cortas.	Empalizada. 2 estratos de células largas.
Haces vasculares Número y disposición	Entre 28 y 33 (20-21 periféricos y 8-12 centrales).	Entre 25 y 30 dispuestos en dos ciclos, con mayor número en el externo.	Entre 5 y 9 (más frecuente 8), dispuestos en un círculo.
Vainas vasculares	2, una externa parenquimática con células de mayor diámetro y pared delgada, otra interna con células de pared gruesa y fibrosa.		
Esclerénquima vascular: 2 casquetes	> tamaño el interno.	> tamaño el externo.	—
Aerénquima Espacios aeríferos	Presentes. Nº: 15-25 (39). Tejido fundamental entre cavidades: 1-3 estratos de células.	Ausentes. Médula continua astericiforme.	Presentes. Nº coincidente con el de haces vasculares. Tejido fundamental entre cavidades: 1-3 estratos de células.
Diafragma Forma de las células	Lobuladas, 9 a 12 lóbulos, espacios intercelulares trilobulados u ovales.	—	Estrelladas, 5 a 7 brazos de extremos lobulados, espacios intercelulares trilobulados.

Tabla 2.- Caracteres cuantitativos en transección caulinar

Especie	Transección	Epidermis (espesor)			Clorénquima	Aerénquima
		Célula epidérmica	Pared externa	Cutícula		
<i>Eleocharis pseudoalbibracteata</i>	684 ± 85,50	18,51 ± 3,85	2,33 ± 0,19	2,40 ± 0,01	79,68 ± 10,10	437 ± 55,00
<i>Juncus balticus</i> subsp. <i>mexicanus</i>	1254 ± 40,06	14,16 ± 0,76	3,30 ± 0,60	2,40 ± 0,01	194,40 ± 23,46	608 ± 20,10
<i>Schoenoplectus californicus</i> var. <i>californicus</i>	1608 ± 31,70	20,40 ± 1,26	2,52 ± 0,38	4,80 ± 0,01	84,00 ± 8,76	1377,50 ± 28,66

Todos los valores están expresados en μm y corresponden a media \pm 1 DS.

Figura 1.- Anatomía caulinar

A-B: corte transversal de tallo de *Eleocharis pseudoalbibracteata*; **A:** vista general (10 x); **B:** detalle de epidermis y haz vascular (40 x). **C-D:** corte transversal de tallo de *Juncus balticus*; **C:** aspecto general (10 x); **D:** detalle de un sector (40x). **E-F:** corte transversal de tallo de *Schoenoplectus californicus*; **E:** aspecto general (10 x); **F:** detalle de un sector (40 x).

Los estomas se disponen en toda la superficie del tallo entre los cordones de esclerenquima subepidérmicos en *Sch. californicus* var. *californicus* y *E. pseudoalbibracteata*. En este último los cordones mencionados tienen forma pentagonal y están formados por 5 a 7 fibras. En *J. balticus* ssp. *mexicanus* los estomas se disponen alineados en toda la superficie del tallo.

E. pseudoalbibracteata presenta células secretoras, con contenidos de TLS (por su denominación en inglés: *tannin-like substances*) en el clorénquima. Las reacciones histoquímicas evidenciaron presencia de lignina, sustancias pécticas y lípidos, en todas las especies. En epidermis de *Sch. californicus* se detectaron mucílagos.

Los atributos morfofuncionales de los órganos fotosintéticos se presentan en la tabla 3. El CMSC fue significativamente mayor en *J. balticus* que en *Sch. californicus* y *E. pseudoalbibracteata*. El TC y la dureza en *E. pseudoalbibracteata* fueron significativamente menores, mientras que el ACE fue significativamente mayor, con respecto a las otras dos especies.

Los compuestos determinados en la caracterización fitoquímica cualitativa se detallan en la tabla 4. Los resultados positivos en las reacciones ensayadas evidencian la presencia de flavonoides en todas las especies evaluadas, del tipo flavona, flavonol, flavanona, flavanonol, leucoantocianidinas y catequinas. La detección de cumarinas resultó positiva, excepto en *E. pseudoalbibracteata*. El análisis de saponinas solo produjo formación de espuma medianamente abundante y estable en los extractos etanólico y acuoso de *J. balticus*.

Tabla 3.- Atributos morfofuncionales de los órganos fotosintéticos

Especie	Tamaño caulinar mm ²	ACE mm ² /mg	CMSC mg/g	Dureza (peso específico) mg/mm ²
<i>Juncus balticus</i> subsp. <i>mexicanus</i>	570,18 ± 92,73	9,72 ± 3,04	243,42 ± 53,26*	0,11 ± 0,03
<i>Eleocharis</i> <i>pseudoalbibracteata</i>	120,35 ± 43,94*	20,62 ± 6,29*	173,41 ± 28,18	0,05 ± 0,02*
<i>Schoenoplectus californicus</i> var. <i>californicus</i>	443,24 ± 42,67	7,89 ± 1,19	175,52 ± 12,12	0,13 ± 0,02

Los valores están expresados en porcentaje y corresponden a media ± 1 DS.

* Medias significativamente diferentes (Test de Tukey p < 0,05).

Tabla 4.- Análisis cualitativos de metabolitos secundarios

Metabolito	Ensayo	<i>Eleocharis</i> <i>pseudoalbibracteata</i>	<i>Juncus balticus</i> subsp. <i>mexicanus</i>	<i>Schoenoplectus</i> <i>californicus</i> var. <i>californicus</i>
Polifenoles	Folin-Ciocalteu	+	+	+
Taninos	Gelatina	+	+	+
	FeCl ₃	-	-	-
	Ferrocianuro de K	-	-	-
Flavonoides	Shinoda	+	+	+
	H ₂ SO ₄ (c)	+	+	+
	Álcalis	+	+	+
	Rosenheim	+	+	+
Cumarinas	Catequinas	+	+	+
	Reacción con hidróxido de amonio	-	+	+
Alcaloides	Dragendorff	-	-	-
	Mayer	-	-	-
	Wagner	-	-	-
Saponinas	Extracto etanólico	-	+	-
	Norma Iram 37501	-	+	-
Antraquinonas	Borntragen	-	-	-
Glicósidos cianogénicos	Reacción de Guignard	-	-	-
Glicósidos cardiotónicos	Reactivo de Baljet	-	-	-
Terpenos / Esteroides	Lieberman-Burchard	-	-	-
	Salkowski	-	-	-

Con respecto a las pruebas realizadas para la detección de esteroides y triterpenos, se registró coloración verde en la interfase, aplicable a carotenoides.

Discusión y conclusiones

El número de haces vasculares, carácter específicamente estable, varía entre las especies comparadas. En *E. pseudoalbibracteata* es reducido en comparación con los valores que pueden alcanzar en otras especies del género (Metcalf, 1971; Govindarajalu, 1975; 1990). Las dos vainas vasculares, una interna de fibras y otra externa parenquimática están presentes en las tres especies, como lo describe Metcalfe (1971). Coincidiendo con lo descrito por otros autores (Metcalf, 1971; Govindarajalu, 1975; 1990) las cavidades aéreas son atravesadas a intervalos por diafragmas de células estrelladas.

Las tres especies presentan vía fotosintética C_3 , que se refleja en su anatomía caulinar. En coincidencia con la descripción realizada por Vegetti (2004) para el tipo anatómico C_3 en Ciperáceas, presentan clorénquima en empalizada u homogéneo; dos vainas de los haces, una externa parenquimática y una interna mestomática; vasos de metaxilema que se ubican por dentro de la vaina mestoma, y baja frecuencia de haces vasculares.

Los autores describen variaciones en la anatomía del tallo como resultado de las condiciones ambientales xéricas o hídricas (Metcalf, 1971). Algunos parámetros indicadores son la cantidad de esclerénquima, el grosor de las paredes epidérmicas y el espesor de la cutícula. *Sch. californicus* presenta la cutícula más gruesa, mientras que *J. balticus* tiene espesor de pared epidérmica tangencial externa mayor. Ambas especies tienen similar cantidad de esclerénquima; en la Ciperácea es de posición subepidérmica mientras que en la Juncácea es mayor la proporción de esclerénquima vascular.

La forma en sección transversal del tallo aéreo es triangular, trígono a cilíndrico en *Sch. californicus*; subcircular irregular o pentagonal en *E. pseudoalbibracteata* y cilíndrico subcomprimido en *J. balticus*. *E. pseudoalbibracteata* presenta mayor proporción de clorénquima con relación al diámetro del tallo.

Las principales diferencias anatómicas entre *Sch. californicus*, *E. pseudoalbibracteata* y *J. balticus* se observan en: la presencia de espacios aeríferos en los dos primeros y su ausencia en el último, que tiene

una abundante médula asteriforme diafragmática; el esclerénquima subepidérmico presente en las dos Ciperáceas está ausente en *J. balticus*, donde es compensado por mayor proporción de fibras vasculares.

La presencia de polifenoles, taninos, flavonoides, cumarinas, alcaloides, saponinas, antraquinonas, glicósidos cianogenéticos y esteroides y triterpenoides, coincide con lo expuesto por Baldizan y col. (2006) en relación con los polifenoles y los compuestos nitrogenados de naturaleza no proteica, y constituyen los dos grupos de metabolitos secundarios de mayor distribución en las plantas superiores.

Los grupos de metabolitos secundarios detectados en este análisis preliminar, no se encuentran registrados en la literatura consultada y significan un aporte al conocimiento fitoquímico de especies nativas de la región patagónica.

Referencias bibliográficas

- Baldizan, A.; Domínguez, C.; García, D.; Chacón, E.; Aguilar, L. (2006). "Metabolitos secundarios y patrón de selección de dietas en el bosque decíduo tropical de los llanos centrales venezolanos". *Zootecnia Tropical* 24(3): 213-232.
- Barboza, G.E.; Cantero, J.J.; Núñez, C; Pacciaroni, A.; Ariza Espinar, L. (2009). "Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora". *Kurtziana* Tomo 34(1-2): 7-365.
- Bertiller, M.B.; Elissalde, N.O.; Rostagno, C.M.; Defossé, G.E. (1995). "Environmental patterns and plant distribution along gradient in Western Patagonia". *Journal of arid Environment* 29: 85-97.
- Bertiller, M.B.; Bisigato, A.J. (1998) "Vegetation dynamics under grazing disturbance. The state and transition model for the Patagonian steppes". *Ecología austral* 8: 191-199.
- Bryant, J.P.; Reichardt, P.B.; Clausen, T.P. (1992). "Chemically mediated interactions between woody plants and browsing mammals". *J. Range Manage.* 45: 18-24.
- Cassola, A. (1988). "Los Mallines". *Rev. Presencia INTA* 16: 11-14.
- Cheeke, P.R. (1995). "Endogenous toxins and mycotoxins in forage grasses and their effects on livestock". *J. Anim. Sci.* 73: 909-918.

- Cornelissen, J.H.C.; Lavorel, S.; Garnier, E.; Díaz, S. Buchman, N.; Gurvich, D.E.; Reich, P.B. ter Steege, H.; Morgan, H.D.; Van der Heiden, M.G.; Pausas, J.G.; Poorter, H. (2003). "A handbook of protocols for standardized and easy measurements of plant functional traits worldwide". *Australian Journal of Botany* 51: 335-380.
- D'Ambrogio, A. (1986). *Manual de Técnicas en Histología Vegetal*. Hemisferio Sur. Buenos Aires: 1-83.
- de Abreu Matos, F.J. (2009). *Introdução à fitoquímica experimental*. Editora da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. Ceará: 1-148.
- Gattuso, M.; Gattuso, S. (1999). *Manual de Procedimientos para el Análisis de Drogas en Polvo*. Universidad Nacional de Rosario: 1-50.
- Govindarajalu, E. (1975). "The systematic anatomy of South Indian Cyperaceae: *Eleocharis* R. Br., *Rhynchospora* Vahl and *Scleria* Bergius". *Adansonia*, ser.2, 14(4): 581-632.
- Govindarajalu, E. (1990). "Cyperaceae Indiae Australis Precursors. A novelty in *Eleocharis* R. Br. and its vegetative anatomy". *Proc. Indian Acad. Sci., Plant sci.* 100(1): 71-75.
- Harborne, J.B. (1993). *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press. London: 1-318.
- Lahitte, H.B.; Hurrell, J.A.; Belgrano, M.J.; Jankowski, L.; Haloua, P.; Mehlreter, K. (1998). "Plantas Medicinales Rioplatenses". LOLA, Buenos Aires: 1-240.
- Metcalf, C.R. (1971). *Anatomy of the Monocotyledons V. Cyperaceae*. Clarendon Press, Oxford: 1-597.
- Molina, J. M. (2000). "Palatabilidad de las hojas del arándano americano (*Vaccinium* spp.) para *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (*Lepidoptera: Noctuidae*)". *Bol. San. Veg. Plagas* 26: 89-98.
- Paz, C.; Buffoni, H. (1986). "Manejo de las 'vegas' en el sur de Santa Cruz". *Rev. Presencia INTA* 8: 40-44.
- Solmo, R.; Siffredi, G. (1993). "Algo más sobre henos de mallines de Precordillera". *Rev. Presencia INTA* 27: 12-13.
- Vegetti, A. C. (2004). "*Vías fotosintéticas y anatomía foliar*". En: Bianco, C. A.; Kraus, T. A. y Vegetti, A. C. (eds.). *La Hoja: Morfología externa y anatomía*. 1ª ed. Universidad Nacional de Río Cuarto - Universidad Nacional del Litoral: 121-138.
- Verettoni, H., (1990). *Contribución al conocimiento de las plantas medicinales de la región de Bahía Blanca y Norte de la Patagonia*. Harris y Cía. Bahía Blanca: 1-389.