

Ciclo nucleolar de los meristemas de *Scirpus californicus* Persoon "totora" del humedal Balsares de Huanchaco (Trujillo, Perú)

Cycle nucleolar of meristems of *Scirpus californicus* Persoon "totora" in the wetland Huanchaco Balsares (Trujillo, Perú)

Ciclo nucleolar dos meristemas de *Scirpus californicus* Persoon "totora" na pantanal Huanchaco Balsares (Trujillo, Peru)

Raúl A. Beltrán Orbegoso¹, Romi N. Guevara Veneros², Claudia E. Toribio Vásquez²

Resumen

El objetivo de la investigación fue describir el ciclo nucleolar de los meristemas de *Scirpus californicus* Persoon "totora", uno de los recursos naturales milenarios más importantes de los ecosistemas continentales de Perú. Diez ejemplares de *S. californicus* P. con parte del rizoma, fueron cuidadosamente recolectados en el humedal costero Balsares del distrito de Huanchaco (Perú), un ecosistema en nivel crítico por la erosión marina e irracionalidad en su manejo; luego fueron llevados al laboratorio de Biología Celular de la Universidad Nacional de Trujillo, en donde fueron mantenidos en agua desionizada para su adaptación en el laboratorio. Luego, los rizomas se mantuvieron en agua salobre al 15‰ para inducir el crecimiento de tejido meristemático, bajo una fotoperiodicidad de luz blanca de 600 nm. El ciclo nucleolar de los meristemas fue estudiado mediante la técnica citoquímica de la impregnación argéntica, la cual usa el nitrato de plata como sustancia reveladora y la microscopía de luz de campo claro. Se halló que los meristemas de *S. californicus* P. presentan 85.6, 5.3, 4.9, y 4.2% de células meristemáticas con nucléolo visible, nucléolo en desorganización; nucléolo ausente y nucléolo en reorganización, respectivamente. El estudio servirá de base para estudios posteriores sobre la reproducción y conservación de *S. californicus* P.

Palabras clave: Citología, humedal, Huanchaco, *Scirpus californicus*.

Abstract

The objective of the study was to investigate the meristems of nucleolar cycle *Scirpus californicus* Persoon "totora" of wetland Huanchaco's Balsares (Trujillo, Peru), one of the most important natural resources of continental ecosystems of Peru. Ten specimens of *S. californicus*, with part of the rhizome, were carefully gathered in the coastal wetland Los Balsares in the Huanchaco (Peru) District. They were then taken to the laboratory of Cell Biology of the National University of Trujillo, where two days in deionized water for adaptation were maintained in the laboratory. Then, the rhizomes were kept in brackish water to 15 ‰ to induce the growth of meristem tissue. The meristems nucleolar cycle was studied by cytochemistry technique of the silver impregnation, which uses silver as revealing substance nitrate and light field microscopy course. Was found that meristems of *S. californicus* P. presented 85.6, 5.3, 4.9 and 4.2% of meristematic cells with visible nucleolus, nucleolar in disarray; nucleolus absent and nucleolus in reorganization, respectively. The study will provide the basis to allow the rationality of extraction and conservation of *S. californicus* P.

Keywords: Cytology, *Scirpus californicus*, wetland, Huanchaco.

Resumo

O objetivo do estudo foi investigar os meristemas de ciclo nucleolar *Scirpus californicus* Persoon "totora" de pantanal na Huanchaco Balsares (Trujillo, Peru), um dos mais importantes recursos naturais dos ecossistemas continentais do Peru. Dez espécimes de *S. californicus* P., com parte do rizoma, reuniram-se cuidadosamente no Pantanal costeiro Los Balsares no distrito de Huanchaco (Peru). Eles então foram levados para o laboratório de Biologia Celular da Universidade Nacional de Trujillo, onde

¹Universidad Nacional de Trujillo, Laboratorio de Biología Celular, rbeltran@unitru.edu.pe

² Tesis de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo

Recibido, 22 de enero de 2015
Aceptado, 12 de marzo de 2015

dois dias em água desionizada para adaptação foram mantidos em laboratório. Em seguida, os rizomas foram mantidos em água salobra para 15 ° /oo para induzir o crescimento do meristema tecido. O ciclo nucleolar os meristemas foi estudado por técnica citoquímica da impregnação de prata, que usa a prata como nitrato de substância revelador e curso de microscopia de campo claro. Verificouse que os meristemas de *S. californicus* P. apresentaram 85,6, 5.3, 4.9 e 4,2% de células meristemáticas com nucléolo visível, nucleolar em desordem; nucléolo ausente e nucléolo na reorganização, respectivamente. O estudo irá fornecer a base para permitir que a racionalidade da extração e conservação do *S. californicus* P.

Palavras-chave: Citologia, Huanchaco, pantanal, *Scirpus californicus*.

Introducción

El ecosistema Balsares de Huanchaco se localiza al noroeste del distrito de Huanchaco (Trujillo, La Libertad, Perú), es tipificado como estanque artificial (Soto, 2014). Ha sido declarado Área Regional Protegida, en la categoría de Reserva Extractiva por el Gobierno Regional, según Resolución Legislativa Regional N° 005-92-AR-LL-VRHT de 1992, sobre una superficie de 46.72 ha. El ecosistema es plenamente dominado por *Scirpus californicus* “totora”, los otros vegetales menores son *Scirpus conglomeratus* y *Bacopa monnieri*, “grama salada” *Distichlis spicata* y por grupos algales de cianofitas, euglenofitas, criptofitas, dinofitas, diatomeas y clorofitas.

En los Balsares de Huanchaco, al menos 200 pozas de sembrado de totora se han perdido en Huanchaco, desde el 2004 hasta el 2012, lo cual pone en riesgo de desaparición al caballito de totora, principal ícono turístico del distrito. La pérdida es la consecuencia de la erosión costera; los oleajes anómalos en los balnearios de la región, agravada por la construcción del molón en el distrito de Salaverry que ha inundado los balsares y los recientes arenamientos del balneario de Huanchaco, debido a los fuertes vientos. En la zona se han perdido 70 metros de terreno por lo que la producción de *S. californicus* P. es mínima, a esto se suma que desconocidos han empezado a arrojar todo tipo de desperdicios generando la acumulación de basura (Ianacone y Alvaríño, 2009). Ante esta situación los pescadores se han visto en la necesidad de utilizar botellas de plástico y tecnopor para poder completar la elaboración de los caballitos de totora, porque se utiliza menos totora y son más livianos, pero dichos elemento son ajenos a la cultura y la tradición del pescador huanchaquero (IMARPE, 2011).

El preocupante impacto ambiental que viene experimentando el humedal Balsares de Huanchaco conlleva también a una intensa pérdida poblacional de su recurso ícono como es *S. californicus*. La totora es un recurso natural que se haya en un preocupante nivel crítico poblacional (INRENA, 1996). La situación se agrava porque no hay un plan inmediato por parte de la Municipalidad de Huanchaco, del Gobierno Regional o de las organizaciones de base del distrito, las cuales son indiferentes al nivel crítico del recurso natural que en alguna oportunidad permitió la sustentabilidad económica, social y cultural de las culturas preincas de Perú.

La realidad problemática expuesta, justifica la realización de estudios básicos en Citología y Ecología de *S. californicus*, tal como viene ocurriendo en diversos países del mundo con sus recursos vegetales autóctonos y endémicos (Al-Baldawi et al., 2015; FAO, 2003; Wang et al., 2014). En lo que corresponde a su distribución nacional, *S.*

californicus muestra tener un patrón de distribución continua a lo largo de la costa peruana, con algunos pequeños vacíos, siendo reportada para 39 localidades diferentes.

El departamento de Lima es el departamento donde se registra la mayor cantidad de colectas, probablemente por ser la localidad donde los humedales han sido estudiados con más constancia. Cajamarca es el único departamento de la sierra donde ha sido registrada esta especie. A pesar de haber encontrado una marcada tendencia de distribución costera, es necesario continuar con las colectas de esta especie a fin de corroborar su presencia en áreas potenciales de distribución como las vertientes occidentales.

S. californicus ha mostrado ser muy adaptable a los hábitats de los humedales costeros, encontrándose en espejos de agua, totorales, zonas arbustivas y gramadales, además de formar grandes comunidades denominadas vegas de ciperáceas. Asimismo, esta especie ha mostrado tener una gran capacidad para resistir los cambios de estrés salino sobre otras especies características de humedales como *Eleocharis pallustris* y *Sagittaria lancifolia*, así como para habitar en múltiples zonas disturbadas como bordes de ríos y acequias (Nebel, 1997).

S. californicus presenta dos tipos de reproducción: a) clonal, por medio de la propagación por rizomas que generan nuevos rametos, y b) sexual, mediante sus flores. Por tanto, los estudios citológicos de sus inflorescencias, frutos, semillas y rizomas van a servir de soporte para futuros trabajos sobre citogenética, segregación, vulnerabilidad, hibridación y heredabilidad. En esa línea, trabajando con los rizomas de la especie, se formuló la interrogante: ¿Qué características citológicas presenta el ciclo nucleolar de los meristemos de *Scirpus californicus* Persoon “tatora” del humedal Balsares de Huanchaco (Trujillo, Perú), al ser sometido al protocolo de la impregnación argéntica?

El nucléolo es la estructura del núcleo interfásico eucariota generado por la actividad transcripcional de genes codificantes del ARN ribosómico (ARNr) (Lodish y col., 2005; Paniagua y col., 2007). Durante el ciclo celular, el nucléolo presenta una progresión de diversas formas denominadas en conjunto ciclo nucleolar; dichas formas reflejan los diversos grados de intensidad que alcanza la actividad transcripcional durante el ciclo vital de una célula.

El ciclo nucleolar, convencionalmente, ha sido secuenciado en cuatro fases: a) la del nucléolo visible u organizado, asociado a las fases G₁, S y G₂ de la interfase, en donde se evidencia una intensa actividad transcripcional de los genes mencionados; b) la del nucléolo en desorganización, asociado al momento final de la fase G₂, en donde el proceso transcripcional disminuye; c) del nucléolo ausente, relacionado con la etapa de la división celular, en donde la transcripción es escasa; y, d) la del nucléolo en reorganización, relacionado con el momento terminal de la telofase, en donde la actividad transcripcional se reanuda (Alberts y col., 2006).

El objetivo de la investigación fue determinar el ciclo nucleolar de los meristemos de *Scirpus californicus* Persoon “tatora” del humedal Balsares de Huanchaco (Trujillo, Perú), usando la técnica citoquímica de la impregnación argéntica (IA) y la microscopía de luz de campo claro. En el trabajo, se reportan las primeras características citológicas de los meristemos procedentes de los rizomas de *S. californicus*.

Materiales y métodos

El humedal conocido como “Balsares de Huanchaco” (8° 4' L.S; 79° 7' L.W), se ubica a 1 km de la caleta del mismo nombre, cerca de la playa El Silencio en el noroeste de Huanchaco (La Libertad, Perú) en una franja de 2 000 m de largo x 80 m de ancho y a 50 m del mar, o al borde de la marea alta en algunos casos. El límite este, corresponde a la base del tablazo de Huanchaco y el oeste a la línea de marea alta (MPT, 1999).



Figura 1. Vista de un “estanque” del humedal Balsares de Huanchaco con ejemplares de *S. californicus*.



Figura 2. Vista de las raicillas de dos ejemplares de *S. californicus* mantenidos en agua desionizada.

Selección y adecuación de los rizomas de *S. californicus* en el laboratorio. En los Balsares de Huanchaco, se seleccionó uno de los “estanques” que presentaba los ejemplares de *S. californicus* con mejor turgencia y color (fig.1); del “estanque” seleccionado se recolectaron diez individuos de *S. californicus* con su rizoma incluido. Las plantas y rizomas fueron llevados al laboratorio de Biología Celular de la Universidad Nacional de Trujillo, colocándolas en agua desionizada para un período de aclimatación de cinco días. Luego se pasaron a placas Petri con agua salobre de 15‰, a la temperatura ambiental promedio de 20°C para inducir la germinación de las raicillas bajo iluminación con luz blanca de aproximadamente 600 nm de longitud de onda.

Protocolo de la técnica citoquímica de impregnación argéntica (IA). De los diez rizomas de *S. californicus* se desarrollaron 25 raicillas (fig. 2). Estas raicillas fueron disectadas para ser sometidas al siguiente protocolo de la técnica citoquímica de la IA:

- Fijación de las raicillas en una mezcla 1:1 de formol al 10% e hidroquinona al 1%.
- Lavado de las raicillas, tres veces, con agua destilada.
- Sumergir las raicillas en AgNO₃ acuoso al 2%, en una estufa a 70°C por diez horas.
- Lavado de las raicillas, tres veces, con agua destilada.
- Postfijación en formol-hidroquinona por una hora.

Luego, los ápices de las raicillas de los rizomas de *S. californicus* P. fueron disectadas y aplastadas en gelatina fenicada y ácido acético al 50% en láminas de vidrio.

Observación de las células de *S. californicus*. Las poblaciones meristemáticas de los rizomas de *S. californicus* fueron observadas en un microscopio óptico Olympus de

campo claro con los objetivos de 4X, 10X, 40 X y 100X. Algunas vistas microscópicas se fotografiaron con una cámara fotográfica Sony DSC 16.1 mp.

Resultados

El ápice de la raicilla del meristemos de *S. californicus* Persoon “tatora”, al ser sometido a la técnica citoquímica de la impregnación argéntica (IA) y observada mediante la microscopia de campo claro, está constituida por dos clases de poblaciones celulares: a) una meristemática de naturaleza asincrónica, en donde se evidencian todas las fases de la mitosis; b) otra diferenciada, con la presencia de formaciones reticulares en su citosol (fig.3).

La población meristemática (figura 3) de la semilla de *S. californicus*, en una proporción aproximada de 75.3%, es asincrónica, pues en un solo campo microscópico, se pueden visualizar las células interfásicas con uno o dos nucléolos esféricos, así como las diversas fases de la mitosis; las células son cuadradas, pequeñas, muy heteroplenóticas a la tinción de la IA, tomando el clásico color marrón que caracteriza a la precipitación del ión plata (Ag^+). La población celular diferenciada con formaciones reticulares en su citosol, de mayor tamaño, en una proporción aproximada de 24.7%.

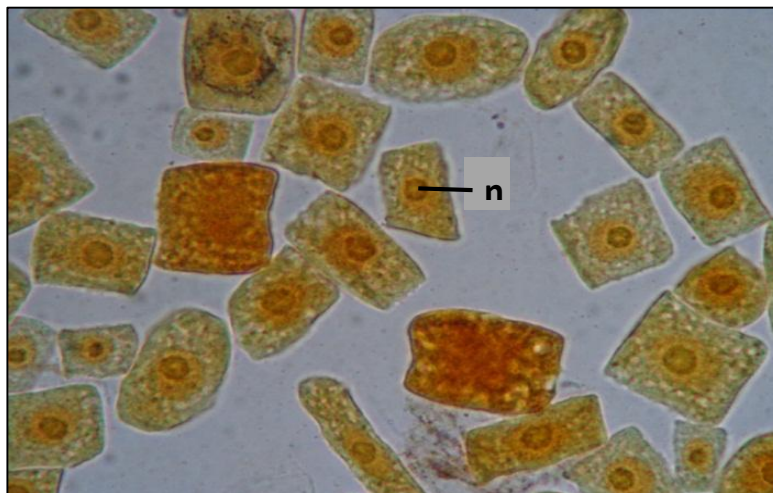


Figura 3. Microfotografía de los meristemos del ápice de la raicilla de *S. californicus* “tatora” en un microscopio de campo claro, a 200 aumentos, sometido a la impregnación argéntica. Nótese, en la mayoría de células el nucléolo (**n**) como una pequeña formación esférica central, de color marrón, dentro del núcleo.

Los meristemos de *S. californicus* P. presentan 85.6, 5.3, 4.9, y 4.2% de células meristemáticas con nucléolo visible, nucléolo en desorganización; nucléolo ausente y nucléolo en reorganización, respectivamente (tabla 1).

Tabla 1. Índices promedio, reales y angulares, de las cuatro fases del ciclo nucleolar de los meristemos del ápice de la raicilla de *S. californicus* “tatora”.

Células meristemáticas de <i>S. californicus</i>					
	nucléolo organizado	nucléolo en desorganización	nucléolo ausente	nucléolo en reorganización	
Promedio real	85,6	5,3	4,9	4,2	100,0
Promedio angular	71,43	13,46	11,20	8,33	
S ²	4,10	0,28	0,12	2,82	
	2,23	0,54	0,29	2,40	
S	2,03	0,52	0,35	1,68	
	1,49	0,73	0,54	1,55	
ES	1,12	0,31	0,2	0,97	
	0,864	0,426	0,313	0,89	

Discusión

La estructura celular de los meristemos del ápice de la raicilla de *S. californicus* Persoon “tatora” ante la técnica de la impregnación argéntica (IA) presenta dos tipos de poblaciones celulares (figura 3), diferente a las tres formas celulares que se observan en el estudio citológico realizado en *Prosopis pallida* Humb. “algarrobo” (Beltrán, 2014). La impregnación argéntica permite visualizar el comportamiento de las regiones argirófilas de las células como el nucleólo y de los cromosomas somáticos y sexuales, como las Regiones Organizadoras Nucleolares las cuales permiten conocer las respuestas de los organismos a los cambios estacionales, análisis citogenético y la comprensión del estudio evolutivo (Andersen y col., 2005; Paniagua y col., 2007).

De las dos poblaciones celulares identificadas en *S. californicus*, una es meristemática, formada por células pequeñas en proliferación mediante mitosis, son casi cuadradas, con pared celular muy delgada, con un núcleo central único y de gran tamaño (figura 3). Las células se colorean intensamente con el clásico tono marrón de la coloración argéntica. Los nucleólos son esféricos, los cuales evidencian su alta actividad transcripcional y proliferativa (figura 3). La IA, identifica las regiones argirófilas de la célula mediante el uso de la plata (AgNO₃); el protocolo se basa en la tinción de una serie de proteínas asociadas al nucleólo como la RNA polimerasa I, nucleolina y la proteína B23 (Alberts y col., 2006; Lodish y col., 2005).

La otra población celular es diferenciada, son células transparentes, carentes de inclusiones, aparentemente con numerosas y pequeñas vacuolas de agua; se colorean

tenuemente con la IA, sus nucléolos son pequeños debido a su baja actividad transcripcional y proliferativa.

En la tabla 1 se presentan las fases del ciclo nucleolar de los meristemas de *S. californicus* P. Las células meristemáticas con nucléolo visible, nucléolo en desorganización; nucléolo ausente y nucléolo en reorganización, son de 85.6, 5.3, 4.9, y 4.2%, respectivamente. Estos datos citológicos posiblemente sean los primeros en reportarse, pues se desconocen investigaciones en ese sentido. En todo caso si se compara con el vegetal *Allium cepa* L. (Beltrán, 2013), que es la especie modelo en estudios citológicos, vemos que los valores de *S. californicus* se hallan ligeramente mayores lo cual supone una intensa actividad transcripcional de la célula.

En la tabla 1, se presentan también los índices promedio angulares de las cuatro fases del ciclo nucleolar hallados en *S. californicus*, los cuales son de 71,43, 13,46, 11,20 y 8,33 para células con nucléolo organizado, en desorganización, ausente y en reorganización, respectivamente. La necesidad de convertir los índices reales a índices angulares, se sustenta en el sentido de ajustar los valores porcentuales de las células halladas con el conteo directo a los valores de una distribución normal, con que se comportan los sistemas biológicos; así mismo, los índices angulares van a permitir que las medidas de tendencia central determinadas en esta investigación como la desviación y error standard nos proporcionen una visión más significativa de los resultados.

En el caso, por ejemplo, del alto índice de 85.6% de células con el nucléolo organizado que se ha encontrado, se explica porque dicha fase está asociada con la etapa de presencia del núcleo y con el período interfásico, que son las etapas de mayor duración en los ciclos nuclear y celular, respectivamente. Situación contraria ocurre con el índice de fase del nucléolo ausente de 4,9%, asociado con la etapa de ausencia de núcleo y con las fases mitóticas de metafase, anafase y telofase temprana, que son las etapas de menor duración en los ciclos nuclear y celular, respectivamente. Por tanto, el mayor o menor índice real de la fase nucleolar está relacionado con la mayor o menor duración de la fase en el ciclo. Los índices de las fases nucleolares hallados en el presente trabajo son similares a los determinados en investigaciones sobre el nucléolo, lo cual indica que la proporcionalidad de las fases es constante a la temperatura en la cual se trabaje, siendo la duración del ciclo lo variable (Alvarez y col., 2003).

El estudio permitirá establecer bases para estudiar la reproducción asexual de *S. californicus* y motivar la formulación de un plan de manejo de los Balsares de Huanchaco que permita la racionalidad de la extracción y la conservación de la especie.

Conclusiones

Los meristemas de *S. californicus* P. presentan 85.6, 5.3, 4.9, y 4.2% de células meristemáticas con nucléolo visible, nucléolo en desorganización; nucléolo ausente y nucléolo en reorganización, respectivamente.

Referencias bibliográficas

Al-Baldawi, I., Sheikh, S., Anuar, N., Suja, F., & Mushrifah, I. (2015). Phytodegradation of total petroleum hydrocarbon (TPH) in diesel-contaminated water using *Scirpus grossus*. *Ecological Engineering*, 74, 463-473. doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.11.

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2006). *Introducción a la Biología Celular* (2ª ed.). Madrid, España: Edit. Médica Panamericana, S.A.
- Alvarez, M., Quezada, C., Navarro, C., Molina, A., Bouvet, P., Krauskopf, M. & Vera, M.I. (2003). An increased expression of nucleolin is associated with a physiological nucleolar segregation. *Biochem. Biophys.* 301: 152–158.
- Andersen JS, Lam YW, Leung AK, Ong SE, Lyon CE, Lamond AI, Mann M. (2005). Nucleolar proteome dynamics. *Nature* (London), 433, 77–83
- Beltrán O., R. (2013). Efectos del agroquímico metamidofos 0,05; 0,1 y 0,15 ml /L y del saborizante glutamato monosódico 1,0; 2,0 y 3,0 g/ L, en los índices de fases del ciclo nucleolar de *Allium cepa* L. *Conocimiento para el desarrollo*, 4(2):109-116. Univ. San Pedro.
- Beltrán O., R. (2014). Citología de la semilla de la algarroba de *Prosopis pallida* (Humb & Bonpl. ex Willd.) “algarrobo pálido”. *Conocimiento para el desarrollo*, 5(1):121-128. Univ. San Pedro.
- FAO. (2003). Foro Servicios Ambientales. Tercer Congreso Latinoamericano de Manejo de Cuencas Hidrográficas. Documento compilatorio. Arequipa, Perú.
- Ianacone J, Alvarino L. (2009). *La Ecotoxicología acuática en el Perú*. Libro de resúmenes del Congreso Internacional de Ecología y Medio Ambiente.
- IMARPE. (2011). Rol de las autoridades frente a la situación ambiental de los humedales de la provincia de Trujillo. Huanchaco, Perú. Disponible en: <http://sial.segat.gob.pe/>.
- INRENA. (1996). Resolución Jefatural 054-96: Estrategia Nacional para la Conservación de Humedales en el Perú.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, S., Ziopursky, S.L., Matsudaira, P., & Darnell, J. (2005). *Molecular Cell Biology*. New York: Edit. Scientific American Books.
- Nebel, B.J. (1999). *Ciencias Ambientales. Ecología y Desarrollo sostenible* (6a ed.). México: Prentice Hall.
- Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Álvarez-Uría M., Fraile, B., Anadón, R. & Sáez, F.J. (2007). *Biología Celular*. (3ª ed.) Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España S.A.
- Soto, E. (2014). *Valoración económica de los Balsares de Huanchaco*. Tesis Maestro, Gestión Económica y Medio Ambiental. Univ. Nac de Trujillo.
- Wang Chao, Zheng Sha-sha, Wang Pei-fang, Qian Jin. (2014). Effects of vegetations on the removal of contaminants in aquatic environments: A review. *Journal of hidrodinamics*, 26(4):497-511. doi: 10.1016/S1001-6058(14)60057-3