

Citología de la semilla de algarroba de *Prosopis pallida* (Humb & Bonpl. ex Willd.) "algarrobo pálido"

Cytology of the seed of carob bean of *Prosopis pallida* (Humb & Bonpl. ex Willd.) "pale carob"

Citologia das semente de alfarroba de *Prosopis pallida* (Humb & Bonpl. ex Willd.) "alfarroba pálida"

Raúl A. Beltrán Orbegoso¹

Resumen

El objetivo de la investigación fue estudiar la citología de la semilla de la algarroba de *Prosopis pallida* (Humb & Bonpl. ex Willd.) "algarrobo pálido", el recurso natural más importante del bosque tropical del nor-este de Perú, de cuyos frutos o algarrobas se obtiene harina, café y la miel de algarrobina, de propiedades energizantes. Las algarrobas fueron recolectadas en el campus de la Universidad de Piura; el protocolo citológico se realizó en el laboratorio de Biología Celular de la Universidad Nacional de Trujillo. Se usó 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 la semilla de la algarroba de *P. pallida* están constituidas por tres tipos de poblaciones celulares: a) meristemática, de naturaleza asincrónica, en donde se evidencian todas las fases de la mitosis; b) diferenciada, con la presencia de formaciones reticulares en su citosol; y c) diferenciada, con la presencia de inclusiones citosólicas cuasi esféricas, relacionadas posiblemente con el color del decocto de la algarroba.

Palabras clave: Citología, algarrobas, *Prosopis pallida*

Abstract

The objective of the research was to study the cytology of the seed of carob beans of *Prosopis pallida* (Humb & Bonpl. ex Willd.) "pale algarrobo", the most important natural resource of the tropical forest of the north-east of Peru, of whose fruit or carob bean gets flour, coffee and honey of algarrobina, energizing properties. Locust beans were gathered on the campus of the University of Piura; the cytological study was conducted in the laboratory of Cell Biology of the National University of Trujillo. Cytochemistry technique was the silver impregnation, which uses silver as revealing substance nitrate and the microscope of . Was found that the seeds of carob beans of *P. pallida* consists of three types of cell populations: a) meristematic, of asynchronous nature, where are evident all phases of mitosis; b) differential, with the presence of reticular inclusions in their cytosol; and other differential, with the presence of large dark formations spherical quasi in the cytosol possibly related to color of the decoction of carob.

Keywords: cytology, carobs, *Prosopis pallida*

Resumo

O objetivo da pesquisa foi estudar a citologia das sementes de alfarroba de *Prosopis pallida* (Humb & Bonpl. ex Willd.) "pálido algarrobo", o recurso natural mais importante da floresta tropical do norte - leste do Peru, de cujos frutos ou alfarroba obtém farinha, café e mel de algarrobina, energizando Propriedades. Alfarroba reuniramse no campus da Universidade de Piura; o estudo citológico foi conduzido no laboratório de Biologia Celular da Universidade Nacional de Trujillo. Técnica citoquímica foi a impregnação de prata, que usa a prata como revelando nitrato de substância. Verificou-se que as sementes de alfarroba de *P. pallida* consiste de três tipos de populações de células: a)meristemáticos, de natureza assíncrona onde são evidentes todas as fases da mitose; b) diferencial, com a presença de for-

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

mações reticular em seu citoplasma; e c) diferencial, com a presença de grandes formações escuras esféricas quasi no citosol, possivelmente relacionado com a cor da decocção de alfarroba.

Palavras-chave: citologia, alfarroba, *Prosopis pallida*

Introducción

Prosopis pallida (Humb & Bonpl. ex Willd.) “algarrobo pálido”, constituye extensos bosques en las regiones de Lambayeque, Piura y Tumbes, donde forma parte importante del denominado Bosque Seco Tropical, abarcando una superficie estimada de 1.8 millones de hectáreas. Es un árbol multipropósito, denominado "rey del desierto", por los diversos beneficios directos e indirectos que proporciona; constituye una excelente especie para control de dunas y contrarrestar la desertificación, fundamentalmente por su precocidad y resistencia a la sequía.

La FAO (2002) afirma que *P. pallida* es un árbol pionero en la recuperación de la fertilidad de los suelos, por su directa influencia en la reducción de la erosión, degradación de los suelos, sedimentación; así como por su capacidad de fijación del nitrógeno del aire y la adición de materia orgánica, a partir de las hojas. Así mismo, su madera dura y resistente lo ha convertido en un material ideal para la edificación de viviendas, elaboración de muebles y otras infraestructuras de campo. Las flores constituyen un excelente recurso para la actividad apícola, para la producción de miel, jalea, polen y cera.

“En Perú, los usos principales del algarrobo son el aprovechamiento de la madera como recurso energético; las hojas, ramas y legumbres (conocidas como algarrobas en norte y huarangas en Nasca) para forraje de ganado, principalmente caprino, y para la producción de miel de algarrobo o algarrobina” (Dostert, Roque, Cano, La Torre y Weigend, 2012, p.11).

El fruto de *P. pallida*, denominado algarroba es usado en la preparación del jarabe de algarrobina, empleado en cócteles, bebidas y dulces que se preparan artesanalmente. Las algarrobas se usan desde tiempos en la obtiene de algarrobina, champús, vinos, chicha, harina para panificación, dulces, saborizantes, edulcorantes, helados y mazamorra de algarroba. Sus semillas sirven para la elaboración de café, alcohol, medicinas naturistas etc. Dostert y col. (2012) señalan que el fruto posee una alta calidad nutritiva, por presentar, en promedio, de 9 al 14% de proteínas, 50% de extracto no nitrogenado, 20% de fibra, 3% de cenizas y buen contenido de vitaminas, minerales y carbohidratos; la semilla es rica en proteínas y grasas, y la cáscara en fibra.

Sin embargo, no obstante la gran cantidad de beneficios que *P. pallida* proporciona al ecosistema y a las comunidades de la zona norte de Perú, *P. pallida* viene siendo actualmente depredado en forma irracional por las familias que habitan los bosques secos y zonas aledañas del norte de Perú. La errada percepción del “algarrobo” como un bien común “de todos y de nadie” y la falta de control de las autoridades, los induce a que sea talado y quemado diariamente para ser convertido en leña y carbón de uso diario en las miles de “pollerías a la brasa” y otras actividades industriales de la zona.

Mom, Burghardt, Palacios y Alban (2000) estiman que hay una pérdida anual de bosque seco de alrededor de 20,000 Há/año en la costa norte, de las cuales 12,386 ocurren en Piura. Este hecho, sumado a la desorganizada expansión de centros poblados, ha conllevado a que el recurso se halle en una preocupante vulnerabilidad

poblacional y genética. Mom y col. (2000) señalan que la propiedad energética de la madera de *P. pallida* de generar 4200 Kcal/Kg como leña o 6500 Kcal/Kg como carbón vegetal, lo han convertido en un recurso muy “solicitado” por diversas industrias por lo que es extraído o quemado en forma permanente durante la noche.

En la región La Libertad, la problemática de la depredación de *P. pallida* es un reflejo de lo que ocurre en nuestro País con el uso irracional de los recursos naturales. Uno de los pocos algarrobales que todavía quedan en La Libertad, es el bosque de Cañoncillo, un oasis ubicado al noreste del distrito de San Pedro de Lloc, provincia de Pacasmayo. El lugar pertenece a 110 propietarios de la zona. De las 1310 hectáreas que componen este recinto natural, cerca de 600 son de *P. pallida*, afirmándose que su tala irracional ha desaparecido desde 1970 al 2012 cerca de 300 hectáreas y que si no se toma una decisión urgente, el ecosistema de Cañoncillo colapsará junto con su flora, fauna, lagunas y restos arqueológicos asociados (F. Galera, 2000).

La realidad problemática expuesta, justifica la realización de estudios ecológicos, culturales, ambientales y genéticos de *P. pallida* en nuestro país, tal como viene ocurriendo en diversos países de Sudamérica con sus recursos arbóreos endémicos. El interés por el estudio de los “algarrobos”, se evidencia por los trabajos en ecología, economía, biogeografía, biodiversidad, biología molecular y genética que actualmente se vienen ejecutando en las diversas especies y variedades de *Prosopis* en países emergentes de África y América como *P. juliflora* en Etiopía, *P. chilensis* (Molina) en Chile y Argentina o *P. alba* y (L) y *P. silocuastrum* D.C. en Bolivia (Carreras, Bessega, López, Saidman & Vilardi, 2012; Ferreyra, Bessega, Vilardi & Saidman, 2004; Haji & Mohamed, 2013; Mondon, Cantamutto, Poverene, 2012; Realini, González, Picca, Font & Poggio, 2010; Sherry, Smith, Patel, Harris, Hand, Trenchard & Henderson, 2011; Velarde, Felkera, Degano, 2003).

Por tanto, los estudios citológicos de sus inflorescencias, frutos y semillas van a servir de soporte para futuros trabajos sobre citogenética, segregación, vulnerabilidad, hibridación y heredabilidad de *P. pallida*. En esa línea, se formuló la interrogante: ¿Qué características citológicas presenta la semilla de la algarroba de *Prosopis pallida* (Humb & Bonpl. ex Willd.) “algarrobo pálido”?

El objetivo de la investigación fue realizar un estudio citológico básico de los meristemos radiculares de la semilla de la algarroba de *P. pallida* (Humb & Bonpl. ex Willd.) “algarrobo pálido”, 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 sobre la composición citológica de la semilla de *P. pallida*.

Materiales y métodos

Selección y adecuación de las semillas de *P. pallida* para inducir el crecimiento radicular. Se identificó un bosque de *P. pallida* (Humb & Bonpl. ex Willd.) “algarrobo pálido” de regeneración natural en el campus de la universidad de Piura (Perú). De 50 árboles, se tomaron 10 frutos, denominadas algarrobos, por cada árbol. De los 500 frutos, se seleccionaron 50 al azar. En el laboratorio de Biología Celular de la Universidad Nacional de Trujillo, se extrajeron dos semillas por cada fruto. Las 100 semillas fueron mantenidas en agua caliente por 24 horas para liberar la cubierta. Luego, la semilla se mantuvo en placas Petri con algodón húmedo a la temperatura ambiental promedio de 20°C para inducir la germinación de la semilla. A las 72 horas,

emergieron las raicillas, cuando éstas, alcanzó 1 cm de longitud, se constituyeron en las unidades experimentales.

Protocolo de la técnica citoquímica de impregnación argéntica (IA). De las 100 semillas mantenidas en germinación, se seleccionaron diez. Por tanto, las diez raicillas de *P. pallida* usadas en el trabajo fueron disectadas para ser sometidas al siguiente protocolo de la técnica citoquímica de la IA:

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

Luego, las raicillas de las semillas del fruto de *P. pallida* fueron disectadas y aplastadas en gelatina fenicada y ácido acético al 50% en láminas de vidrio.

Observación de las células de *P. pallida*. Las poblaciones celulares de las semillas de *P. pallida* 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 de la semilla de *Prosopis pallida* “algarrobo pálido”, al ser sometido a la técnica citoquímica de la impregnación argéntica (IA) y observada mediante la microscopia de campo claro, está constituida por tres tipos 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; y c) otra también diferenciada, con la presencia de formaciones citosólicas oscuras cuasi esféricas, relacionadas posiblemente con el color y la composición proteica de la algarrobina (fig.1).

La población meristemática (fig.1-a) de la semilla de *P. pallida*, en una proporción aproximada de 70%, es asincrónica, pues en un solo campo microscópico, se pueden visualizar las células interfásicas con dos, tres o cuatro nucleólos esféricos, así como las diversas fases de la mitosis; las células son cuadradas, pequeñas, muy heteropícnóticas a la tinción de la IA, tomando el clásico color marrón que caracteriza a la precipitación del ión plata (Ag⁺). La población celular diferenciada (fig.1-b) con formaciones reticulares en su citosol, de mayor tamaño, en una proporción aproximada de 10%. La población celular diferenciada (fig.1-c), con la presencia de formaciones citosólicas oscuras cuasi esféricas, relacionadas posiblemente con la composición proteica de la algarrobina, en una proporción aproximada de 20%.

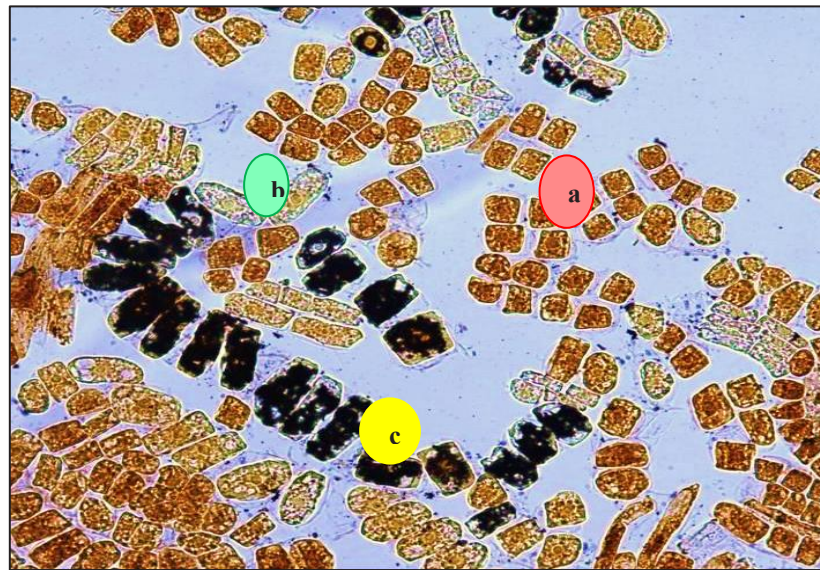


Figura 1. Microfotografía del ápice radicular de la semilla de *P. pallida*, en un microscopio de campo claro, a 200 aumentos, mostrando tres tipos de poblaciones celulares: a) meristemática, b) diferenciada con formaciones reticulares; y c) diferenciada con inclusiones.

La población celular diferenciada (fig.1-c, fig. 2), con formaciones citosólicas oscuras cuasi esféricas, que ocupan aproximadamente del 80 al 85% del volumen celular.

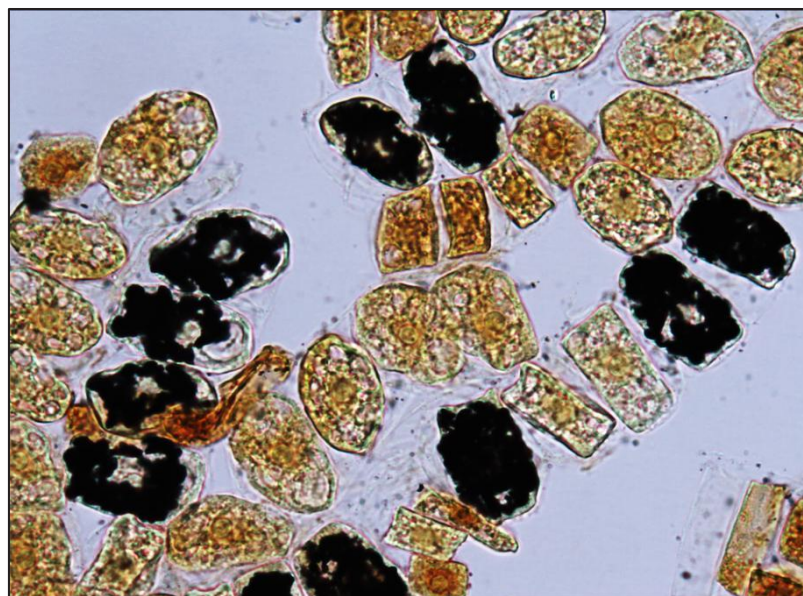


Figura 2. Microfotografía de la población celular diferenciada hallada en la semilla de *P. pallida*, en un microscopio de campo claro, a 1000 aumentos, mostrando prominentes inclusiones citosólicas oscuras relacionadas posiblemente con la composición proteica de la algarrobina.

Discusión

La estructura celular de las raicillas de la semilla de la algarroba de *Prosopis pallida* (Humb & Bonpl. ex Willd.) ante la técnica de la impregnación argéntica (IA) presenta tres tipos de poblaciones celulares, diferente de las formas celulares que suelen observarse en el estudio citológico realizados en otros vegetales (Beltrán, 2010).

La impregnación argéntica permite visualizar el comportamiento de las regiones argirófilas de las células y cromosomas; en los últimos años, se han generado muchos estudios en Genética Animal y Vegetal con protocolos basados en la IA; la razón se debe a que las regiones argirófilas del núcleo, como el nucleólo y de los cromosomas somáticos y sexuales, como las Regiones Organizadoras Nucleolares (RONs) vienen permitiendo obtener nuevos conocimientos sobre la modulación de las respuestas de los organismos a los cambios estacionales, análisis citogenético y la comprensión del estudio evolutivo (16, 17).

La población meristemática son células pequeñas que se hallan en proliferación, son casi cuadradas, con pared celular muy delgada, con un núcleo central único y de gran tamaño incluido en un citosol extenso (fig. 1-a). Las células son muy heteropícnóticas a la coloración argéntica, toman el clásico tono marrón que caracteriza a las muestras sometidas a la IA, presentan nucleólos esféricos, los cuales evidencian su alta actividad transcripcional y proliferativa. La IA, identifica las regiones argirófilas de la célula mediante el uso de la plata (AgNO_3); 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, las cuales evidencian la actividad transcripcional y proliferativa de las células y de las regiones organizadoras nucleolares localizadas en ciertos cromosomas.

La población celular diferenciada (fig. 1-b) no es proliferativa, son células transparentes, carentes de inclusiones, aparentemente con numerosas y pequeñas vacuolas de agua; son escasamente picnóticas a la tinción de la IA, sus nucleólos son pequeños debido a su baja actividad transcripcional y proliferativa. Probablemente son las células primarias que posteriormente se diferenciarían en las células encargadas de la notable propiedad de *P. pallida* de almacenar agua.

La población celular diferenciada (fig. 1-c, fig. 2) tampoco es proliferativa, son células de mayor tamaño con numerosas y prominentes inclusiones citoplásmicas oscuras, generadas por la actividad metabólica de la célula y que estaría constituida por las proteínas y polisacáridos hidratados que proporcionan el color y calidad nutritiva a los productos de la algarroba. Al respecto, Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, ... Walter (2006) señalan que “aún en las células que no se encuentran en división, las proteínas se sintetizan en forma continua; éstas proteínas recién sintetizadas se deben enviar a todos los organelos de una manera precisa, algunas para ser vertidas al exterior y otras para ser almacenadas en la célula” (p. 502). Los productos de la algarroba como la harina, café y miel de algarrobina, son de alto valor en la gastronomía nacional e internacional, lo cual podrían convertirse en importantes productos nutracéuticos que podrían convertirse en fuentes de ingreso económico de las familias que habitan los bosques secos del norte de Perú en bajas condiciones socio económicas (Dostert y col, 2012).

El estudio ha permitido establecer un conocimiento citológico básico de la población meristemática radicular de las semillas de *P. pallida*. Se espera que los

resultados sirva de soporte a futuras investigaciones genéticas y ambientales para un adecuado manejo y conservación de *P. pallida* y de los recursos naturales que conforman nuestra amenazada biodiversidad; sobre todo *P. pallida* que hoy es sometido a una severa deforestación que incluso representa el 90% de la producción de carbón vegetal.

Conclusiones

La semilla de la algarroba de *P. pallida* están constituidas por tres tipos de poblaciones celulares: una meristemática y dos diferenciadas.

La población celular diferenciada con numerosas y prominentes inclusiones citosólicas estaría relacionada con formaciones proteicas y glucídicas constituyentes del decocto de la algarroba.

El conocimiento citológico básico de las raicillas de las semillas de *P. pallida*, servirá de soporte para investigaciones genéticas y ambientales que permitan un adecuado manejo del recurso endémico, que hoy es sometido a una intensa depredación.

Referencias bibliográficas

- 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.
- Beltrán O.,R. (2010). *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.* Trabajo de habilitación. Univ. Nac. Trujillo, Perú.
- Carreras, R., Bessega, C., López, C., Saidman, B.O., & Vilardi, J.C. (2012). Componentes de variación genética cuantitativa y molecular en *Prosopis alba* (leguminosae). *Journal of Basic and applied Genetics*, 23 (1): 278.
- Dostert, N., Roque, J., Cano, A., La Torre, M., y Weigend, M. (2012). *Hoja botánica: Algarrobo*. Cooperación Alemana al desarrollo. Lima, Perú.
- FAO. (2002). *El género Prosopis "algarrobos" en América Latina y El Caribe. Distribución, bioecología, usos y manejo*. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/006/ad314s /AD314S08.htm#ch1.24>.
- Ferreyra, L.I., Bessega, C., Vilardi, J.C., & Saidman, B.O. (2004). First report on RAPDs patterns able to differentiate some Argentinean species of section Algarobia (*Prosopis*, Leguminosae). *Genética* 121: 33–42.
- Galera, F.M. (2000). Las especies del género *Prosopis* (algarrobos) de América Latina con especial énfasis en aquellas de interés económico. Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Versión en línea: <http://www.fao.org/docrep/006/ad314s/ad314s00.htm> [03.08.2011].

- Haji, J. & Mohamed, A. (2013). Economic impact of *Prosopis juliflora* on agropastoral households of Dire Dawa Administration, Ethiopia. *African Journal of Agricultural*, 8(9):768-799. doi: 10.5897/AJAR12.014
- Mom, M., P., Burghardt A., D., Palacios R., A., & Alban, L. (2000). Los algarrobos peruanos: *Prosopis pallida* y su delimitación. *Arnaldoa*, (1):39-48.
- Mondon, A., Cantamutto, M., & Poverene, M. (2012). Caracterización molecular de plantas en zonas simpátricas de *Helianthus* anuales en Argentina. *Journal of Basic and applied Genetics* 23 (1): 315.
- Realini, M.F., González, G.E., Picca, P., Font, F., & Poggio, L. (2010). Caracterización molecular en especies de *Opuntia* (Cactaceae, Opuntioideae) del sur de Sudamérica. *Journal of Basic and applied Genetics*, 23 (1): 340.
- Sherry, M., Smith, S., Patel, A., Harris, P., Hand, P., Trenchard, L., & Hendrson, J. (2011). RAPD and microsatellite transferability studies in selected species of *Prosopis* (section Algarobia) with emphasis on *Prosopis juliflora* and *P. pallida*. *Journal of Genetics*, 90(2):251-164.
- Velarde, M., Felkera, P., & Degano, C. (2003). Evaluation of Argentine and Peruvian *Prosopis* germplasm for growth at seawater salinities. *Journal of Arid Environments*, 55:515–531.