



Citología básica de los meristemas radiculares de las semillas de *Prosopis pallida* (Humb & Bonpl. ex Willd.) “algarrobo pálido” mediante la impregnación argéntica

Basic cytology of root meristems of the seeds of *Prosopis pallida* (Humb & Bonpl. ex Willd.) "pale algarrobo" using silver impregnation

Raúl Antonio Beltrán Orbegoso¹

⁽¹⁾Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Biología Celular y Genética

Resumen

Prosopis pallida (Humb & Bonpl. ex Willd.) “algarrobo pálido” es el recurso natural más importante del bosque tropical del nor-este de Perú por su gravitante influencia en la economía agraria de la zona y por su rol de autoregulator ambiental de la eco-región. El objetivo de la investigación fue aperturar el conocimiento citológico de los meristemas radiculares de las semillas de *P. pallida* mediante la impregnación argéntica (IA), la cual se basa en la identificación de las regiones argirófilas de la célula mediante el uso de nitrato de plata. Se usaron semillas de frutos de *P. pallida* procedentes de Piura (Perú), realizándose un recuento de 1000 células meristemáticas mononucleadas por raicilla. Los resultados que se presentan son los primeros acerca del índice mitótico, índices de fases de la mitosis y del ciclo nucleolar. Se halló que los meristemas radiculares de *P. pallida* presentan un índice mitótico de 17.5%; e índices profásico, metafásico, anafásico y telofásico de 51.4%, 11.4 %, 7.4% y 29.8%, respectivamente. Las células interfásicas exhiben 2, 3 y 4 nucléolos esféricos, lo cual evidencia una alta actividad transcripcional. El presente estudio servirá de soporte a futuras investigaciones genéticas y ambientales de *P. pallida* para un adecuado manejo y conservación del recurso, hoy que es sometido a una intensa depredación.

Palabras claves: Citología; *Prosopis pallida*; impregnación argéntica

Abstract

Prosopis pallida (Humb & Bonpl. ex Willd.) "pale carob" is the most important natural resource of the tropical forest of the North - East of Peru by its overriding influence in the Agriculture of the area economy and the role of environmental autoregulator of the ecoregion. The objective of the research was opening the cytological knowledge of root meristems of seeds of *P. pallida* using silver impregnation (SI), which is based on the identification of the regions argyrophil cell using silver nitrate. Used seeds from fruits of *P. pallida* from Piura (Peru), performing a count of 1000 by rootlet mononuclear meristematic cells. The results presented are the first about the mitotic index, phases of mitosis and nucleolar cycle indices. It was found that root meristems of *P. pallida* has a mitotic index of 17.5%; e rates further, anafásico, profásico and telofásico of 51.4%, 11.4%, 7.4% and 29.8%, respectively. Interfásicas cells exhibit 2, 3 and 4 spherical nucleoli, which demonstrates a high transcriptional activity. This study will serve as a support for future environmental and genetic



research of *P. pallida* for proper management and conservation of the resource, today that is subjected to an intense predation.

Key words: Cytology; *Prosopis pallida*; silver impregnation

Introducción

El género *Prosopis* hace referencia a vegetales rústicos, adaptados a los territorios áridos y semiáridos de Perú, Ecuador, Chile y Colombia a lo largo de la costa del Pacífico en suelos y hábitats arenosos, arcillosos, calcáreos, pedregosos y salinos ⁽¹⁾. La notable adaptación de *Prosopis* se debe a las propiedades de fijar el nitrógeno, por la relación simbiótica con bacterias del género *Rhizobium*; de absorber el agua, por su sistema radicular que puede llegar a zonas muy profundas de la napa freática y de tolerar períodos prolongados de sequías ^(2,3,4,5). Estas cualidades, lo han convertido en el soporte de diversos programas de reforestación en ambientes áridos de Sudamérica, a fin de detener el problema de la desertificación y de mantener diversos ecosistemas de bosques secos que hoy se hallan en peligro de colapsar.

En Perú, *Prosopis pallida* (Humb & Bonpl. ex Willd.) “algarrobo pálido” constituye la especie más abundante en los ecosistemas de los bosques secos de Tumbes, Piura y Lambayeque. Se le encuentra asociado a otros recursos arbóreos menores como *Erytheca ruizii* “pasallo”, *Acacia acracantha* “faique”, *Parkinsonia aculeata* “palo verde”, *Loxopterygium huasango* “hualtaco”, *Bursera graveolens* “palo santo”. La especie tiene una importancia gravitante en la economía agraria de la zona norte pues sirve actualmente de soporte económico y alimentario de aproximadamente 414853 familias campesinas y en la autoregulación de la naturaleza del bosque seco tropical ^(6,7,8,9).

Sin embargo, a pesar de su importancia ambiental y económica, la especie es talada diaria e indiscriminadamente por pobladores de los bosques y foráneos, se estima que anualmente son depredadas unas 10 mil hectáreas de bosques, para ser usado como carbón de leña. En el bosque de Cañoncillo, San Pedro de Lloc, La Libertad, la situación es similar; 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.

Este panorama se complica por la casi inexistente investigación citológica, genética y ambiental de *P. pallida* en Perú, muy distinto a lo que ocurre en países vecinos en donde el estudio genético y molecular de *Prosopis* es numeroso ^(10,11,12,13,14,15,16,17). Esta realidad problemática justifica la realización de estudios citológicos a fin de obtener un conocimiento básico sobre el recurso; el estudio celular inicial debe centrarse por ejemplo, en el índice mitótico e índice de fases mitóticas de los meristemas y en la dinámica del ciclo del nucléolo, pues dichos aspectos proporcionan una aproximación a la dinámica y fisiología de la célula, del tejido y del recurso.



Existen muchas técnicas citoquímicas e histoquímicas para el estudio citológico, siendo la técnica de la impregnación argéntica (IA) una de las más usadas en el estudio de los índices y del ciclo nucleolar. La IA se basa en la identificación de las regiones argirófilas de la célula mediante el uso de nitrato de plata. La IA permite visualizar el comportamiento de las regiones argirófilas de las células y cromosomas ^(18,19,20); 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 regulación del envejecimiento celular mediante su relación con la enzima telomerasa, la modulación de las respuestas de ciertos vertebrados al stress celular ocasionado por los cambios estacionales, el análisis citogenético y la comprensión del estudio evolutivo de los organismos ^(21,22,23,24,25).

Por tanto, el objetivo de la investigación fue aperturar el conocimiento citológico de los meristemos radiculares de las semillas de *P. pallida* mediante la impregnación argéntica (IA). Los resultados que se presentan son los primeros acerca de los índices de fases del ciclo celular, de los índices de fase mitótico y del comportamiento del nucleólo de *P. pallida*. El estudio permitirá establecer un conocimiento citológico básico de la población mononucleada de *P. pallida*, a fin de que sirvan de soporte a futuras investigaciones genéticas y ambientales que permitan un adecuado manejo y conservación de *P. pallida* para un adecuado manejo y conservación del recurso, hoy que es sometido a una intensa depredación; y, por extensión de los recursos naturales que conforman la amenazada biodiversidad de Perú.

Materiales y métodos

Selección y adecuación de las semillas de *Prosopis 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, denominados algarrobas, 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 a la temperatura ambiental promedio de 20°C para inducir la germinación de su raicilla. Cuando ésta, alcanzó 1 cm de longitud, se constituyeron en las unidades experimentales.

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



f) Disección y aplastamiento de los ápices de las raicillas en ácido acético al 50% en láminas de vidrio.

Observación de las células meristemáticas de *P. pallida*. Las muestras de los meristemos radiculares de las semillas de *P. pallida* fueron observadas en un microscopio óptico Olympus con los objetivos de 4X, 10X, 40 X y 100X. Algunas vistas microscópicas se fotografiaron con una cámara fotográfica Sony DSC 16.1 mp. Los índices mitótico e interfásico, los índices de fases de la mitosis y el comportamiento del nucleólo se determinaron mediante el recuento de 300 células mononucleadas en cada una de las tres semillas de *P. pallida*.

Los datos obtenidos fueron sometidos a las medidas de tendencia central (media) y de dispersión (varianza, desviación standard y error standard), previa transformación arco sen de los datos originales para ajustarlos a una distribución normal.

Resultados

Estructura citológica del ápice de la raicilla de *P. pallida*. El ápice de la raicilla al ser sometido a la Impregnación Argéntica (IA), está constituido por una población meristemática típica, muy picnótica a la plata. Los meristemos están asociados a células diferenciadas de la cofia o caliptra, las cuales tienen prominentes inclusiones citoplásmicas oscuras. También se observan, en menor proporción, células diferenciadas poco picnóticas (fig.1).

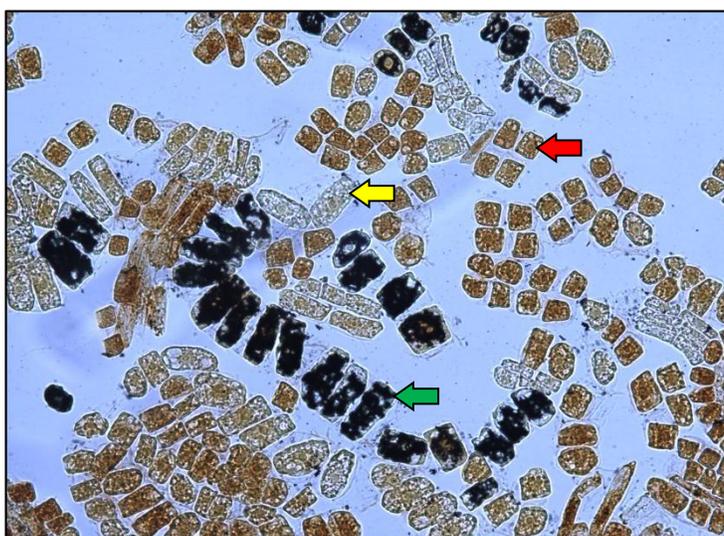


Fig.1: Microfotografía del ápice radicular de la semilla de *P. pallida* mostrando la típica población meristemática (flecha roja), las células de la cofia o caliptra (flecha verde) y las células poco picnóticas (flecha amarilla), (200x).

Índice mitótico de los meristemos.

Tabla 1: Índices mitótico e interfásico de los meristemos de *P. pallida*

	Índice mitótico	Índice interfásico	
Promedio	18,89%	81.11%	100%
S2	1.2540	1.2543	
ES	0.3541	0.3541	

Índice de fases de los meristemos.

Tabla 2: Índices de fases mitóticas de los meristemos de *P. pallida*

	Índice profásico	Índ. metafásico	Índice anafásico	Índice telofásico
Promedio	57,9%	11,0%	6,46%	24,64%
S2	20,76	2,45	6,14	56,107
ES	1,4388	0,4933	0,78	2,37

Ciclo nucleolar de los meristemos radiculares.

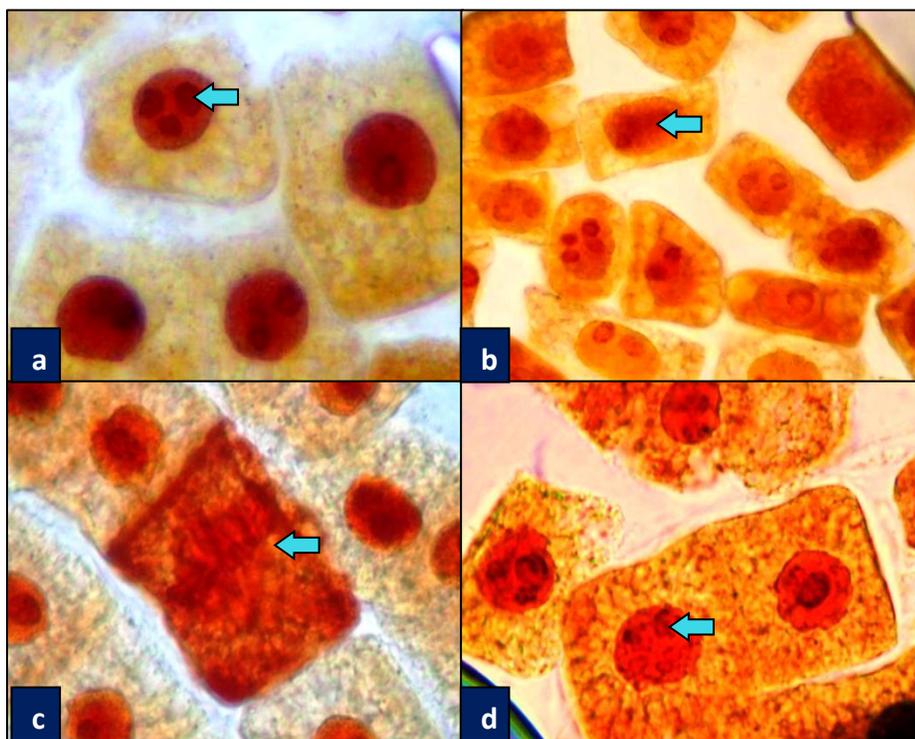


Fig. 2: Las cuatro fases del ciclo nucleolar en los meristemos de *P. pallida*: a) nucléolo organizado; b) nucléolo en desorganización; c) nucléolo ausente y d) nucléolo en reorganización (los nucléolos se indican con flecha celeste) (1000x).



Discusión

El ápice de la raicilla de la semilla de *Prosopis pallida* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) “algarrobo pálido”, al ser sometido a la Impregnación Argéntica (IA), y observado al microscopio de luz (ML), de campo claro, está constituido por una población meristemática de células pequeñas, casi cuadradas, con pared celular muy delgada, con un núcleo central único y de gran tamaño incluido en un citosol extenso (fig. 1, flecha roja). Las células son muy heteropicnóticas a la coloración argéntica, toman el clásico tono marrón que caracteriza a las muestras sometidas a la IA, presentan nucléolos esféricos, los cuales evidencian su alta actividad transcripcional y proliferativa^(18,19,20,21,31,32).

Los meristemas de *P. pallida* están asociados a numerosas células diferenciadas procedentes de la cofia o caliptra del ápice (fig. 1, flecha verde); las células tienen numerosas y prominentes inclusiones citoplásmicas oscuras, generadas por la actividad metabólica de la célula y que estaría constituida por proteínas y polisacáridos hidratados almacenados en vesículas procedentes de dictiosomas^(33,34,35).

Las prominentes células de la cofia o caliptra, identificadas en el trabajo, explican porque *P. pallida*, al igual que las restantes especies del género *Prosopis*, presentan sistemas radiculares que pueden llegar hasta los 50 metros de profundidad. Además de proteger el meristema apical y de ayudar a la raíz en su penetración a través del suelo, la caliptra desempeña un papel importante en el control de la respuesta de la raíz a la gravedad^(34,36). Esta cualidad le permite al vegetal resistir a las sequías y prosperar en suelos muy diversos. Esto a su vez explica, porque las diferentes especies de *Prosopis* son usadas actualmente en programas de reforestación en América para detener el problema de la desertificación y mantener los bosques secos que se hallan en peligro de extinción.

En el ápice de la raicilla se hallan también células casi transparentes (fig.1, flecha amarilla), carentes de inclusiones, aparentemente con numerosas y pequeñas vacuolas de agua; son escasamente picnóticas a la tinción de la IA, sus nucléolos son pequeños debido a su baja actividad transcripcional y proliferativa^(18,19,20,21). Probablemente son las células primarias que posteriormente se diferenciarían en las células encargadas de la notable propiedad de *P. pallida* de almacenar agua^(1,2,3).

Comparando la estructura celular del ápice de la raicilla de *P. pallida* con los ápices radiculares procedentes de los bulbos de *Allium cepa* L., por ejemplo, se puede afirmar que en *A. cepa* L. las células de la cofia o caliptra no son tan prominentes ni numerosas, lo cual indicaría que la morfología celular de estas células estaría determinada por el ambiente y sustrato en que se desarrolla el vegetal, pues *P. pallida* habita en suelos casi secos, mientras que *A. cepa* lo hace en suelos de mayor humedad^(34,35,36).

En el presente estudio se determinaron el índice mitótico (IM) y los índices de fases de la mitosis como son el índice profásico (IP), el índice metafásico (IMe), el índice anafásico (IA) y el índice telofásico (IT). Estos valores constituyen una importante base de todo estudio



citológico de un recurso, pues un aspecto importante en fisiología vegetal es saber cómo las plantas regulan sus tasas de crecimiento^(33,34).

El índice de producción celular en un meristemo tiene dos componentes distintos: a) el número de células en división, determinado por el tamaño de dichas células y del meristemo; y b) el porcentaje de división celular, determinado por la duración del ciclo celular. Ambos componentes pueden explicar los distintos mecanismos existentes que hacen que se produzcan cambios en la producción celular y para cuantificar estos índices se utilizan comúnmente medidas como el índice mitótico y el índice de fases⁽³³⁾.

Por tanto, el índice mitótico y los índices de fase, proporcionan una idea preliminar de la duración de los períodos interfásico y de división de las células meristemáticas. Se halló en el presente trabajo que los meristemas radiculares de las semillas de *P. pallida* presentan un índice mitótico de $18,89\% \pm 0,35$ e índice interfásico de $81,11\% \pm 0,35$ (tabla 1, fig. 3), los valores fueron hallados según la fórmula de López-Sáez y Fernández-Gómez, 1969⁽³⁰⁾.

Como no existe otro trabajo similar sobre índices de fases en plantas, los datos encontrados en este trabajo se contrastaron con los índices standarizados de *A. cepa* L., a 20°C, en donde el IM es 13,0% y el II es 87,0%.

Las diferencias encontradas entre los dos IM antes mencionados, indican que los meristemas de *P. pallida* presentan una mayor frecuencia de células en división que *A. cepa* L. y que, por tanto, la duración de su ciclo mitótico sería también de mayor duración, aunque esto debe verificarse con una futura investigación en donde se defina la duración del ciclo celular de *P. pallida*.

El nucléolo es la estructura que tipifica a los núcleos interfásicos. El nucléolo es generado por la actividad transcripcional de grandes bucles de ADN denominados regiones organizadoras del nucléolo (NORs)^(18,19,20). Los NORs están asociados a proteínas de naturaleza ácida no histónicas, como la RNA polimerasa I, nucleolina y la proteína B23; justamente, estas proteínas tienen la propiedad de precipitarse ante técnicas citológicas argentícas que usan el elemento plata (Ag) en su estado de mayor oxidación (+2).

Las regiones que reaccionan con la plata, se les denomina argirófilas o AgNORs; justamente, estas regiones AgNORs vienen siendo usadas actualmente como indicadores tempranos de melanomas y carcinomas en el tejido linfoide humano^(24,25) y como sensores del efecto citotóxico de los productos químicos; por tanto, si la técnica argéntica visualiza las AgNORs, visualizarán también el nucléolo. Las células animales presentan por lo general un solo nucléolo; sin embargo, los meristemas vegetales pueden presentar dos y tres nucléolos en condiciones normales, o hasta cuatro como es el caso de *P. pallida* (fig. 2)

En la tabla 2 y figura 4 se presentan los índices de las fases de la mitosis de los meristemas de *P. pallida*, el índice profásico (IP) es $57,9\% \pm 1,44$; el índice metafásico (IMe) $11,0\% \pm 0,49$; el índice anafásico (IAn) $6,46\% \pm 0,78$ y el índice telofásico (IT) $24,64\% \pm 2,37$. Comparado también con *A. cepa*, cuyos índices standarizados, a 20°C, son IP 47,0%; IMe 13%; IAn 9,5% e IT 30,5%, se puede afirmar preliminarmente que los meristemas de *P. pallida* presentan también índices de fases mitóticos distintos a los de *A. cepa* L.



Los índices de fase, proporcionan una idea preliminar de la duración de los períodos interfásico y de división de las células meristemáticas. Vemos que los meristemas de *P. pallida*, en división, presentan más de la mitad de sus células en profase, pues el IP es de $57,9\% \pm 1,44$, superior al valor de 47% hallado en *A. cepa* L., por lo que el tiempo de duración probable de esta fase mitótica en *P. pallida* debe de ser mayor que el tiempo de profase de *A.*

cepa L. Se sabe que en *A. cepa* L., la duración de su ciclo celular, a 20°C, es de 18,7 horas, en donde 16,5 horas corresponden a la interfase y 2,2 horas al periodo de división; así mismo, que los tiempos de duración de la profase, metafase, anafase y telofase son de 1,2 horas; 28 minutos; 7 minutos y 35 minutos, respectivamente^(21,30,31).

En cuanto a los índices metafásico ($11,0\% \pm 0,49$) y anafásico (IAN) ($6,46\% \pm 0,78$) de *P. pallida*, los valores son menores en comparación con los de *A. cepa* (13,0 y 9,5%, respectivamente), por tanto podría inferirse que las duraciones de la metafase y anafase de *P. pallida* son menores que las duraciones de metafase y anafase en *A. cepa*, esto significaría que el ordenamiento de los cromosomas en la línea ecuatorial de la célula y la posterior migración de los cromosomas hacia los polos, requeriría supuestamente de un tiempo menor en *P. pallida*.

En la fig. 7, se presentan microfotografías de las cuatro fases del ciclo nucleolar identificadas en los meristemas de *P. pallida* "algarrobo pálido": nucléolo organizado (7a), nucléolo en desorganización (7b), nucléolo ausente (7c) y nucléolo en reorganización (7d). En la fig. 7a se observa una célula interfásica con un núcleo central y esférico que contiene a tres nucléolos organizados, los cuales son esféricos y con bordes definidos. Cuando el nucléolo se encuentra organizado indica que la célula se halla en su máxima actividad transcripcional^(18,19,20,32).

En la fig. 7b, el puntero señala un nucléolo en desorganización, se observa muy difuso, dentro de un núcleo en donde la cromatina comienza a transformarse en cromosomas. En este momento, la célula está pasando de G₂ a profase.

En la fig. 7c, la célula carece de nucléolo; esta fase del nucléolo ausente caracteriza a las células que se hallan en profase, metafase, anafase y telofase temprana. En estas fases los cromosomas se hallan tan empaquetados que la actividad transcripcional es casi ausente.

En la fig. 7d se presenta la fase del nucléolo en reorganización, aquí se pueden visualizar a los nucléolos como pequeños gránulos que empiezan a reconstituirse. Esta fase del ciclo nucleolar corresponde al meristemo en telofase terminal y los primeros momentos de G₁

Los nucléolos, en la fase organizada, son esféricos y bien definidos; los nucléolos en desorganización y reorganización son pequeños y de forma irregular; y los nucléolos ausentes, como es lógico, no se visualizan^(18,19,20). Estas formas diversas, reflejan intensidades distintas del fenómeno molecular de la transcripción, en donde la célula forma ARN a partir del ADN, con lo cual se deduce que un nucléolo organizado, evidencia una intensa transcripción y un nucléolo ausente, la ausencia o escasa presencia del fenómeno^(18,19,20).

Las cuatro fases del ciclo nucleolar descritas en el presente trabajo no solo indican cambios de agregación o disgregación de ribonucleoproteínas, sino de una dinámica muy compleja



que abarca la actuación conjunta de proteínas nucleares y citoplásmicas. En efecto, la proteómica del nucléolo, indica que en su conformación no solo se requiere de la actuación de la ARN polimerasa I y de proteínas existentes en los centros fibrilar, fibrilar denso y granular, sino también de proteínas encargadas del procesamiento de los ARNs como B23, NOP52, nucleolina y RPP29; y fibrilarina, que se intercambian continuamente con el nucleoplasma y con otros compartimientos nucleares^(18,19,20,32).

Prosopis pallida (Humb. & Bonpl. ex Willd.) “algarrobo pálido” es un árbol multipropósito, por los diversos beneficios directos e indirectos que proporciona. Sus notables propiedades de fijar el nitrógeno atmosférico, gracias a su relación simbiótica con bacterias *Rhizobium*, y de absorber el agua ubicada a grandes profundidades, lo convierten en el recurso ideal para detener el problema de la desertificación y de mantener los diversos ecosistemas de bosques secos que hoy se hallan en peligro de colapsar^(1,2,3). Por lo que se hace necesaria la implementación de una administración eficiente y funcional que posibilite su aprovechamiento sustentable no sólo en la región Piura, sino en las demás regiones áridas y semiáridas de Perú.

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

Conclusiones

La población meristemática mononucleada de *P. pallida*, presenta un índice mitótico de $18,89\% \pm 0,35$ é índice interfásico de $81,11\% \pm 0,35$; así como índices profásico, metafásico, anafásico y telofásico de $57,9\% \pm 1,44$; $11\% \pm 0,49$; $6,46\% \pm 0,78$ y $24,64\% \pm 2,37$.

Las células interfásicas de *P. pallida* exhiben 2, 3 y 4 nucléolos esféricos, lo cual evidencia una alta actividad transcripcional de las célula.

Las células meristemáticas radiculares de la semilla de *P. pallida*, son muy heteropcnóticas a la impregnación argéntica.

Los meristemos de *P. pallida* están asociados a una prominente cofia o caliptra formada por células con abundantes inclusiones.

Referencias bibliográficas

- (1) **Burkart A.** A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoideae). J. Arnold Arbor. 1976; 57(4):450–525.
- (2) **Galera FM.** 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).2000. Versión en línea:
<http://www.fao.org/docrep/006/ad314s/ad314s00.htm> [03.08.2011].

- (3) **Burghardt A, Brizuela M, Mom M, Albán L, Palacios R.** Análisis numérico de las especies de *Prosopis* L. (Fabaceae) de las costas de Perú y Ecuador. *Rev. Perú. Biol.* 2010;17(3): 317–323.
- (4) **Ferreira R.** Estudio sistemático de los algarrobos de la costa norte del Perú. Dirección de Investigación Forestal y de Fauna, Min. de Agricultura, Lima, Perú. 1987.
- (5) **Mom MP, Burghardt AD, Palacios RA, Alban L.** Los algarrobos peruanos: *Prosopis pallida* y su delimitación. *Arnaldoa*, 2000;(1):39-48.
- (6) **FPCN.** Reglamento de la Veda de los Bosques Secos del Norte: una experiencia participativa. Fundación Peruana para la Conservación de la Naturaleza (FPCN). Lima.1995.
- (7) **ONERN.** Perfil Ambiental del Perú. Lima. ONERN. 1986.
- (8) **INEI,** IX Censo Nacional de Población y IV Vivienda.2007.
- (9) **Jara F, Otivo J.** Potencial Forestal de la Región Grau. Proyecto 110010. Inventario Forestal. Cipca- Piura.1989.
- (10) **Ferreira LI, Vilardi JC, Tosto DS, Julio NB, Saidman BO.** Adaptive genetic diversity and population structure of the “algarrobo” [*Prosopis chilensis* (Molina) Stuntz] analysed by RAPD and isozyme markers. *Eur J Forest Res*, 2010;129:1011–1025
- (11) **Ferreira LI, Bessega C, Vilardi JC, Saidman BO.** First report on RAPDs patterns able to differentiate some Argentinean species of section *Algarobia* (*Prosopis*, Leguminosae). *Genética*, 2004;121: 33–42.
- (12) **Sherry M, Smith S, Patel A, Harris P, Hand P, Trenchard L, Henderson J.** RAPD and microsatellite transferability studies in selected species of *Prosopis* (section *Algarobia*) with emphasis on *Prosopis juliflora* and *P. pallida*. *Journal of Genetics*, 2011;90(2):251-164.
- (13) **Velarde M, Felkera P, Degano C.** Evaluation of Argentine and Peruvian *Prosopis* germplasm for growth at seawater salinities. *Journal of Arid Environments*,2003; 55:515–531.



-
- (14) **RealiniMF, GE González, P Picca, F Font, L Poggio.** Caracterización molecular en especies de *Opuntia* (Cactaceae- Opuntioideae) del sur de Sudamérica. *Journal of Basic and applied Genetics*, 2010;23 (1): 340.
- (15) **Mondon A, Cantamutto M, Poverene M.** Caracterización molecular de plantas en zonas simpátricas de *Helianthus* anuales en Argentina. *Journal of Basic and applied Genetics*, 2012;23 (1): 315.
- (16) **Carreras R, Bessega C, López C, Saidman BO, Vilardi JC.** Componentes de variación genética cuantitativa y molecular en *Prosopisalba* (leguminosae). *Journal of Basic and applied Genetics*, 2012;23 (1): 278.
- (17) **Pometti CL, Saidman BO, Cialdella AM, Vilardi JC.** Estudio de la diferenciación molecular entre tres especies afines de Acacia. *Journal of Basic and applied Genetics*, 2012;23 (1): 175.
- (18) **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** *Molecular biology of the cell.* 2ª ed. New York: Garland Science; 2002.
- (19) **Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez-Uría M, Fraile B, Anadón R, Sáez FJ.** *Biología Celular.* 3ª ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España S.A.; 2007.
- (20) **Berkaloff A, Borget J, Favard P, Guinebault M.** *Biología y Fisiología celular.* 2ª ed. Barcelona: Edic. Omega. S.A.; 1996.
- (21) **Beltrán RA.** Efectos del agroquímico metamidofos a las concentraciones de 0,05; 0,1 y 0,15 ml /L y del saborizante glutamato monosódico a las concentraciones de 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. 2010
- (22) **Rosete M, Padros M, Vindrola O.** El nucléolo como un regulador del envejecimiento celular. *Buenos Aires: Medicina* 2007; 67: 183-194.
- (23) **Alvarez M, Quezada C, Navarro C, Molina A, Bouvet P, Krauskopf M, Vera M.I.** An increased expression of nucleolin is associated with a physiological nucleolar segregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 301: 152–158.
- (24) **Alvarez M, Molina A, Quezada C, Pinto R, Krauskopf M, Vera M.I.** Eurythermal fish acclimatization and nucleolar function: a review. *J. Therm. Biol.* 2004; 29: 663–667.
- (25) **Pich A, Chiusa L, Margaria E.** Role of the Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions in tumor detection and prognosis. *Cancer Detect and Prevent* 1995; 19(3): 282-291.
- (26) **Deann AR, Barboza GC, Carrizo M.** evidencias citogenéticas novedosas en *Larnax* (Solanacea). *Journal of Basic and applied Genetics*, 2012;23 (1): 321.



- (27) **Marcano L, Carruyo I, Montiel X, Bracho M y Soto L.** Valoración del efecto tóxico del cadmio en células meristemáticas de cebolla *Allium cepa* L. *Revista Fac. Agron.* 1999, 16: 476-487.
- (28) **Lodish H, Baltimore D, Berk S, Ziopursky SL, Matsudaira P, Darnell J.** *Molecular Cell Biology.* New York: Edit. Scientific American Books. INC; 2005.
- (29) **Beemster GT, Baskin T.** Analysis of Cell Division and Elongation Underlying the Developmental Acceleration of Root Growth in *Arabidopsis thaliana* *Plant Physiology* April, 1998;116(4):1515-1526.