

ORIGINAL

ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE *JUGLANS JAMAICENSIS* C. DC.

In vitro establishment of explants of *Juglansjamaicensis* C. DC.

Ing. Adrián Alejandro Díaz-Martín, Universidad de Granma, adiazm@udg.co.cu, Cuba

Dr. C. Silvio Meneses-Rodríguez, Profesor Titular, Universidad de Granma,
smenesesr@udg.co.cu, Cuba

Dr. C. José Luis Rodríguez-Sosa, Profesor Titular, Universidad de Granma,
jrodriguezs@udg.co.cu, Cuba

Recibido: 28/11/2017- Aceptado: 3/012018

RESUMEN

El trabajo se desarrolló en el Centro de Biotecnología de las plantas de la Universidad de Granma con el objetivo de evaluar el establecimiento *in vitro* de explantes de *Juglansjamaicensis*. Para ello se utilizaron segmentos nodales y hojas colectados de un árbol de 8 años de edad, ubicado en el Banco de germoplasma del Centro de Estudios, así como nueces recolectadas de árboles de la localidad de California, municipio de Buey Arriba. Se establecieron tres experimentos bajo un diseño completamente aleatorizado, para 20 explantes (segmentos nodales, explantes foliares y explantescotiledonares) por cada tratamiento y dos réplicas. Se usaron como desinfectantes alcohol al 70%, hipoclorito de sodio (NaClO), bicloruro de mercurio (HgCl₂) 0,1%, CuSO₄ al 2% así, como Mancozeb al 1%. Como resultados se logró la implantación aséptica de los explantescotiledonares utilizando NaClO (0,5%) y HgCl₂ (0,1%), previo a una doble desinfección de las nueces con empleo de NaClO, Mancozeb y HgCl₂, y su rompimiento mediante presión con una prensa metálica manual dentro del flujo laminar, y por lo tanto el material más adecuado para el establecimiento *in vitro* de *Juglansjamaicensis* fueron los fragmentos cotiledonares. Asimismo se contribuye a la multiplicación *in vitro* de esta especie para la recuperación de sus poblaciones, la reducción de su categoría de amenaza y el aprovechamiento de bienes y servicios ambientales.

Palabras clave: *Juglansjamaicensis*; *in vitro*; amenazada; explantes

ABSTRACT

The work was developed in the Plant Biotechnology Center of the University of Granma with the objective of evaluating the *in vitro* establishment of *Juglansjamaicensis* explants. To this end, nodal segments and leaves collected from an 8-year-old tree were used, located in the Germplasm Bank of the Study Center, as well as nuts collected from trees from the locality of California, municipality of Buey Arriba. Three experiments were established under a completely randomized design, for 20 explants (nodal segments, leaf explants and cotyledonary explants) for each treatment and two replications. 70% alcohol, sodium hypochlorite (NaClO), mercury bichloride (HgCl₂) 0.1%, 2% CuSO₄ as well as 1% Mancozeb were used as disinfectants. As a result, aseptic implantation of cotyledonary explants was achieved using NaClO (0.5%) and HgCl₂ (0.1%), prior to a double disinfection of the nuts using NaClO, Mancozeb and HgCl₂, and breaking them by pressure. with a manual metal press within the laminar flow, and therefore the most suitable material for the *in vitro* establishment of *Juglansjamaicensis* were the cotyledonary fragments. It also contributes to the *in vitro* multiplication of this species for the recovery of its populations, the reduction of its category of threat and the use of environmental goods and services.

Key words. *Juglansjamaicensis*; *in vitro*; threatened; explants

INTRODUCCION

Los árboles constituyen uno de los componentes más vulnerables de la flora cubana. La transformación de sus hábitats y su explotación, generalmente implica la destrucción total de individuos clave para el mantenimiento de las poblaciones (Lazcano *et al.*, 2004). La especie *Juglansjamaicensis* C.DC., es un ejemplo de especies que han sufrido estas acciones.

Juglansjamaicensis C.DC., es un árbol raro de los bosques húmedos montanos de Cuba, la isla de La Española y Puerto Rico Norte. Según Francis y Alemañy (1994), este árbol de tamaño mediano produce unas flores pequeñas y verdes, una nuez comestible y una madera similar a la del nogal negro (*J. nigra* L.) de la América del Norte, resistente y duradera; excelente, para muebles finos, instrumentos musicales, y artesanía, razón por la cual ha sufrido las consecuencias de la deforestación y está sometida a la desaparición progresiva (Rivera *et al.*, 2008).

Atendiendo a la escases de sus poblaciones naturales, entidades regionales le han dado

atención priorizada a la especie. Un informe del, U.S. Fish and Wildlife Service (2013), la clasifica en Puerto Rico como en estado de peligro, e indica que desde 1992 The Center for Plant Conservation le ha asignado el estatus de Prioridad A, en la que se consideran aquellas especies en estado crítico que pueden ser extinguidas en el rango de cinco años. En Cuba, el Reglamento de la Ley Forestal de 1999, en su artículo 95, ratifica la prohibición de tala del nogal del país (*Juglans insularis*), en tanto que la Lista Roja de las Plantas Vasculares Cubanas ubica a las dos subespecies mencionadas anteriormente en la categoría Amenazada en Peligro Crítico (Ministerio de la Agricultura, 1999)

En estudios más recientes, realizados en Topes de Collantes por Hechavarría *et al.* (2008) sobre la respuesta fenológica de *Juglans jamaicensis* al aumento de la temperatura, se encontraron alteraciones fenológicas que son de importancia en la actividad reproductiva, lo que puede comprometer su capacidad futura de adaptación al cambio climático y conduce hacia potenciales poblaciones en contracción o decline, lo que sugiere la necesidad de diseñar el manejo del taxón, atendiendo a la situación de peligro crítico de extinción (Rodríguez *et al.*, 2014).

El Programa de Desarrollo Forestal de la provincia Granma ha trazado un grupo de estrategias para dar solución a insuficiencias que aun preexisten, por ejemplo, el rescate e incremento de las poblaciones de especies amenazadas, como en el caso de la especie *Juglans jamaicensis* C.DC subsp *jamaicensis* (Rodríguez y Aguilar, 2007).

En años recientes, el Instituto de Investigaciones Forestales ha identificado nuevas demandas emergentes del contexto forestal nacional, que determinan la necesidad de acometer líneas, hoy apenas esbozadas o inexistentes, de investigación y entre las principales, contempla el desarrollo de la silvicultura clonal, a partir del empleo de genotipos élite y de la biotecnología.

Las vías naturales de propagación de *Juglans jamaicensis* C.DC., son poco efectivas para la multiplicación masiva, lo que ha hecho que se encuentre en peligro de extinción, y no se cuenta con información referida a la especie, sobre procedimientos de cultivo *in vitro* como paso preliminar para el diseño de sistemas de micropropagación que permitan la recuperación de las poblaciones en breve plazo, su conservación y su aprovechamiento silvicultural, por lo tanto, el objetivo del trabajo fue evaluar el establecimiento *in vitro* de explantes de *Juglans jamaicensis* C.DC.

POBLACIÓN Y MUESTRA

Se utilizaron segmentos nodales y hojas de *Juglansjamaicensis* colectados de un árbol de 8 años de edad, que se encuentra en el Banco de germoplasma del Centro de Estudios y nueces recolectadas en la localidad de California perteneciente al municipio de Buey Arriba.

- Experimento 1: Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Juglansjamaicensis*

El experimento tuvo como objetivo el establecimiento aséptico de los segmentos nodales para su utilización posterior en organogénesis directa. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con 20 segmentos nodales por cada tratamiento y dos réplicas.

Desinfección de los segmentos nodales.

Se tomaron ramas apicales con el empleo de una tijera de poda, las ramillas fueron despojadas de los limbos foliares para la obtención de segmentos nodales, se cortaron aproximadamente a una longitud de dos centímetros y se introdujeron en frascos de vidrio (250 ml) que contenían una solución de agua y detergente al 1%. Luego se colocaron en agitación continua en la zaranda orbital durante media hora, para eliminar sedimentos y partículas grandes. Al finalizar, se lavaron con agua corriente.

En la cabina del flujo laminar se procedió a sumergir los segmentos nodales en una solución de alcohol al 70% durante 55 segundos, se lavaron cuatro veces con agua destilada estéril y se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO), que contenía diferentes concentraciones (1 y 2%) durante (10 y 20 minutos) para un total de cuatro tratamientos (Tabla 1). Luego se realizaron cuatro enjuagues con agua destilada estéril y se eliminó con ayuda de un bisturí la parte afectada por el hipoclorito de sodio y se colocaron con su extremo basal introducido unos 2 mm en el medio de cultivo, a razón de un explante por frasco.

Tabla. 1. Tratamientos de desinfección aplicados a los segmentos nodales de *J. jamaicensis*

Tratamientos	Alcohol (%)	Tiempo (s)	NaClO⁻ (%)	Tiempo (Min)
T₁	70	55	1	10
T₂	70	55	1	20
T₃	70	55	2	10
T₄	70	55	2	20

A partir de las 72 horas de realizada la siembra se evaluaron las siguientes variables en porcentajes: contaminación, fenolización y necrosamiento.

- Experimento 2. Establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Juglansjamaicensis* para inducción a callogénesis

El experimento tuvo como objetivo el establecimiento aséptico de los explantes foliares para la inducción a callogénesis. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con 20 explantes foliares por cada tratamiento y dos réplicas.

Desinfección de las hojas.

Se realizaron dos métodos de desinfección, eliminando cada desinfectante con cuatro enjuagues con agua destilada estéril:

- I. Se tomaron las hojas y se realizó el mismo proceso del experimento anterior, luego en la cabina del flujo laminar se sumergieron durante 20 minutos en hipoclorito de sodio al 2%, y se añadieron con bicloruro de mercurio (HgCl_2 0,1%) durante 5 minutos.
- II. Se sumergieron durante 30 minutos en hipoclorito de sodio al 1,5% y se dejaron reposar durante 24 horas en agua destilada estéril dentro del flujo laminar. Transcurrido este tiempo, las hojas se sumergen en una solución de Mancozeb 1%, se enjuagaron hasta que desaparecieron los residuos del fungicida, a continuación se introdujeron en hipoclorito de sodio al 1% durante 15 minutos, luego se sometieron a bicloruro de mercurio HgCl_2 0,1% durante 5 minutos, seguido de CuSO_4 al 2% durante 20 minutos.

Con ayuda del bisturí se cortaron fragmentos de las partes laterales del limbo foliar y del nervio central de 1 x 1 cm (explantes) y se colocaron con la cara adaxial en contacto con la superficie del medio, a razón de un explante por frasco. Para los dos tipos de desinfección se emplearon dos tratamientos hormonales, con 20 frascos en cada uno: T_0 , el medio basal; T_1 , el medio basal suplementado con 2 mg.L^{-1} AG3.

A partir de las 72 horas de realizada la siembra se evaluaron las siguientes variables: contaminación, (%); fenolización, (%) y necrosamiento, (%).

- Experimento 3. Establecimiento *in vitro* de fragmentos cotiledonares de *Juglansjamaicensis*

El experimento tuvo como objetivo el establecimiento aséptico de explantes cotiledonares de *Juglansjamaicensis*. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con 20 explantescotiledonares por cada tratamiento y dos réplicas.

Desinfección de semillas y fragmentos cotiledonares.

Se realizaron dos métodos de desinfección, eliminando cada desinfectante con cuatro enjuagues con agua destilada estéril:

En el momento del experimento casi todos los frutos habían perdido el pericarpio, total o parcialmente.

Inicialmente, las nueces fueron sumergidas en una solución de agua y detergente al 1% durante una hora y cepilladas enérgicamente con un cepillo de alambre, con la finalidad de eliminar los restos de pericarpio.

- I. Las nueces libres del pericarpio y bien limpias, se mantuvieron durante 2 horas en NaClO al 1%, se lavaron cuatro veces y luego se colocaron durante 24 horas en un refrigerador doméstico, en un recipiente con agua estéril. Transcurrido este tiempo, las semillas se abrieron fuera del flujo laminar quebrando el tegumento con ayuda de un cuchillo y un martillo. Se logró mayor rapidez en el procedimiento, en tanto que la testa y el material cotiledonar resultaron fragmentados en disímiles porciones (Fig. 1).

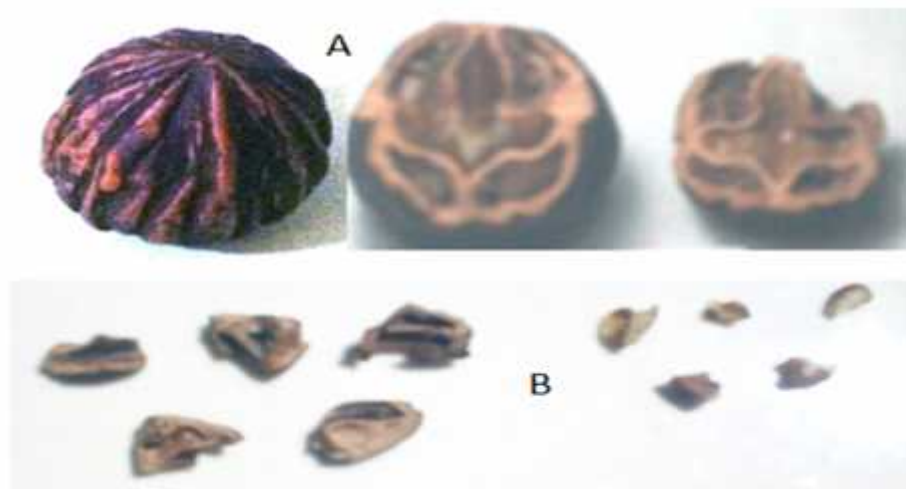


Fig. 1. Nuez de *J. jamaicensis* mostrando la estructura interna (A) y fragmentos de la testa y de los cotiledones (B)

Los fragmentos cotiledonares obtenidos fueron llevados al flujo y desinfectados, primero con alcohol al 70% durante 30 segundos, luego con hipoclorito de sodio al 2% durante 5 minutos.

Con el bisturí se cortaron porciones de los fragmentos cotiledonares de aproximadamente 1 cm^2 y se colocaron en contacto con la superficie del medio, a razón de un explante por frasco.

II. La desinfección preliminar de las nueces se realizó como en el experimento anterior. Transcurrido el tiempo indicado, las nueces se sumergieron en una solución de Mancozeb al 1% durante 30 min, después de lo cual se enjuagaron hasta que desaparecieron los residuos del fungicida. Luego se colocaron en hipoclorito de sodio al 2% durante 15 minutos y se llevaron al flujo laminar, posteriormente se sumergieron en HgCl_2 al 0,1% durante 10 min. La ruptura de la testa de las nueces se realizó en el flujo laminar ejerciendo presión sobre la testa con ayuda de una prensa mecánica manual (Fig. 2).



Fig. 2. Ruptura de la cubierta seminal de las nueces de *Juglansjamaicensis* dentro del flujo laminar

Los fragmentos de cotiledón fueron aislados con pinzas y bisturíes, lavados dos veces con agua destilada estéril y desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio seguido de HgCl_2 al 0,1% por 3 minutos, al 0,5% por 10 minutos; seguido de HgCl_2 al 0,1% por 3 minutos. Después son recolectados en una placa de petri y cortados en porciones de aproximadamente 1 cm^2 que se inoculan en el medio de cultivo.

A partir de las 72 horas de realizada la siembra se evaluaron las siguientes variables: contaminación, (%); fenolización, (%) y necrosamiento, (%).

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

- Desinfección de segmentos nodales.

Los resultados del Experimento 1 sobre establecimiento *in vitro* de segmentos nodales indicaron que la desinfección con NaClO solamente en concentraciones hasta el 2% y tiempo de inmersión hasta 20 min, no es una alternativa viable.

El 100% de los explantes se perdió por contaminación externa, interna o por exudaciones debido a que los métodos de desinfección utilizados en la fase de establecimiento no siempre eliminaron las poblaciones de microorganismos asociadas a los tejidos de los explantes que fueron inoculados. Igual resultado se alcanzó en *J. regia* en experimentos de implantación *in vitro* de explantes nodales utilizando material procedente de brinzales de dos años (Alcón, *et al.*, 2009).

Como se aprecia, el establecimiento de explantes nodales es un tanto complejo para especies leñosas de este género, lo cual sugiere que una alternativa para solventar los problemas con la desinfección del material adulto sería inducir la brotación en laboratorio o en ambiente controlado, como lo hicieron Uribe y Cifuentes (2004) en *Legrandiaconcinna*.

Establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Juglansjamaicensis* para inducción a callogénesis.

Desinfección 1

Con la variante 1 de desinfección, al igual que en el caso de los segmentos nodales, el establecimiento de los explantesfoliaresno fue satisfactorio pues la totalidad resultó contaminada por hongos. Al parecer, los explantes foliares, para su total desinfección necesitan un tratamiento más fuerte, como los usados satisfactoriamente por otros autores.

Por ejemplo, Avilés *et al.* (2009), han logrado la desinfección de hojas de *Juglansneotrópica* establecidas en casas de cultivo, con el empleo de etanol 20% v/v seguido de hipoclorito de sodio (1 gL^{-1}) con inmersiones de hasta 15 min.

En otros casos, el éxito de la desinfección en material de campo se ha logrado incluyendo entre los agentes desinfectantes, algún fungicida.

Desinfección 2.

También, para la variante 2, todos los explantes foliares se perdieron. Sin embargo, el fracaso no respondió a la contaminación, sino a la fuerte desinfección utilizada causante de la necrosis del 100% de los explantes. Teniendo en cuenta el fracaso de la desinfección empleada en la

variante anterior, en esta segunda se empleó una desinfección mucho más fuerte con hipoclorito de sodio en dos etapas, 30 y 15 min, además de Mancozeb y bicloruro de mercurio.

Borges *et al.* (2015), utilizando una desinfección para el establecimiento de *Dioscoreaalata* L. (ñame), encontraron que a medida que aumentaban las concentraciones de hipoclorito de sodio, también lo hacía la cantidad de explantes nodales necrosados, la cantidad fue excesiva a partir de las concentraciones de 2%, aunque también se redujo la contaminación.

Establecimiento *in vitro* de explantescotiledonares de *Juglansjamaicensise* inducción a callogénesis.

Desinfección 1

Debido a la dureza de las nueces de *J. jamaicensis*, la extracción del endospermo entero resultó una tarea difícil. Con este procedimiento el material cotiledonar terminó fragmentado en disímiles porciones. En el presente caso, un cincuenta por ciento de las semillas presentó necrosamiento y contaminación interna (Fig. 3), lo cual, no solamente las hace inútiles para utilizarlas como explante, sino que arriesga la asepsia del área de trabajo, ya que antes de su ruptura no se puede determinar la presencia de estos problemas.

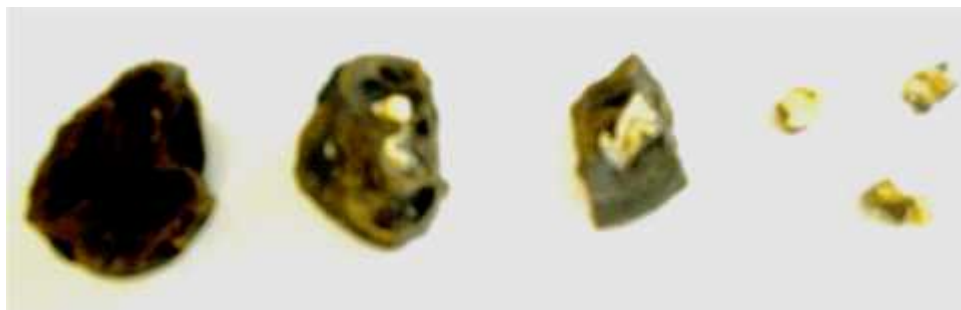


Fig. 3. Nuez fragmentada mostrando necrosamiento y contaminación microbiana interna

Los explantes establecidos después de la Desinfección 1 corrieron la misma suerte que los utilizados en los experimentos anteriores, a pesar que se originan de órganos diferentes, aunque todos proceden de individuos adultos. Todos los explantescotiledonares acabaron contaminándose por hongos y bacterias y no aparecieron indicios de fenolización en el medio de cultivo.

Este resultado puede explicarse por la débil desinfección realizada en los explantes que además, fueron obtenidos fuera del flujo laminar y en un área de trabajo, donde se abrieron semillas que estuvieron contaminadas. En el caso de la metodología de desinfección descrita,

se empleó NaClO al 2% pero solo durante 5 minutos, no se empleó HgCl₂ y antes de la entrada del flujo laminar, no se empleó ningún fungicida. En tanto que las semillas procedieron de árboles ubicados en zonas de la Sierra Maestra y tuvieron más de 5 meses de recolectadas, por lo cual los factores bióticos y abióticos pudieron ejercer su acción degradativa durante varios meses.

Fors (1967) ha expresado que los parámetros de calidad de las semillas son influenciados por el suelo y además por la propia procedencia de las semillas. Rodríguez (2015), en su tesis sobre la conservación de *J. jamaicensis*, ha planteado que las condiciones ambientales y sanitarias de los árboles influyen sobre el desarrollo de las semillas. En correspondencia con esto, en condiciones de dispersión natural, dicho autor ha encontrado una baja densidad de semillas viables, así como una baja velocidad germinativa.

Por su parte, Rivera *et al.* (2011), en un estudio realizado sobre autoecología de la especie en el Valle de San Andrés, provincia de Pinar del Río, encontró que las semillas recolectadas después del tercer mes de graneadas van disminuyendo su poder germinativo, desde un 25%, hasta un 4%, cuando fueron recolectadas entre 3 y 6 meses después de la dispersión.

Desinfección 2.

En la variante Desinfección 2, las semillas previamente tratadas con hipoclorito de sodio desde el día anterior, fueron sometidas a una segunda desinfección con Mancozeb 1%, hipoclorito nuevamente y bicloruro de mercurio. Solo después de ello es que fueron abiertas dentro del flujo laminar con la ayuda de una prensa mecánica. Esto permitió una eliminación más precisa de las nueces contaminadas internamente.

Los fragmentos cotiledonares no contaminados fueron desinfectados nuevamente según la metodología prescrita lográndose un promedio de asepsia de 64,6%, según se aprecia en la Tabla. 2.

Tabla 2. Desinfección de explantescotiledonares

Tratamiento	Cant de frascos	No contam	%
T ₀	15	11	73,3
T ₁	12	8	66,6
T ₂	15	12	80,0
T ₃	13	5	38,5

Promedio	-----	-----	64,6
----------	-------	-------	------

Pérez y Quenta (2015), coincidentemente, encontraron que la presencia de hongos fue el principal agente de contaminación en cotiledones de *J. boliviana*. En tal sentido (citando a Seta *et al.*, 2009) explican que los hongos del género *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* y *Rhizopus* se encuentran en los cotiledones de la semillas de *Juglans* sp.

En el caso que se describe (Desinfección 2) la contaminación se produjo tanto por hongos como por bacterias (Fig. 4).



Fig. 4. Contaminación de explantescotiledonares por hongos (A) y bacterias (B)

CONCLUSIONES

1. Se logró la implantación aséptica de los explantescotiledonares utilizando NaClO (0,5%) y HgCl₂ (0,1%), previo a una doble desinfección de las nueces de *Juglansjamaicensis* con empleo de NaClO, Mancozeb y HgCl₂, y su rompimiento mediante presión con una prensa metálica manual dentro del flujo laminar.
2. El material más adecuado para el establecimiento *in vitro* fueron los fragmentos cotiledonares.
3. Se contribuye a la multiplicación *in vitro* de esta especie para la recuperación de sus poblaciones, la reducción de su categoría de amenaza y el aprovechamiento de bienes y servicios ambientales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Lazcano, J. C., R. Berazaín, A. T. Leiva y S. Oldfield (2004). Memorias del primer taller para la

categorización de árboles cubanos. In Taller para la categorización de árboles cubanos. Ciudad de La Habana, Cuba: Jardín Botánico Nacional de Cuba y Fauna & Flora International.

Francis, J. K. Y S. Alemañy (1994). *Juglans jamaicensis* C. DC. Nogal. Edtion ed. New Orleans, LA: U.S: Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station.

Rivera, C., A. Urquiola, Y. García, *et al.*, (2008). Fenología de *Juglans jamaicensis* subsp. *Insularis* (griseb.) H. Schaarschm. en el bosque semideciduo de la base de mogotes del valle de San Andrés. Avances.

U.S. Fish And Wildlife Service (2013). Nogal or West Indian Walnut (*Juglans jamaicensis*). 5-Year Review: Summary and Evaluation. In. Boquerón, Puerto Rico: Caribbean Ecological Services Field Office.

Ministerio De La Agricultura (1999). Reglamento de la Ley Forestal. Resolución No.330/99. Cuba.

Rodríguez, J. L., H. Barrero Y C. Aguilar (2014). Morfometría de *Juglans jamaicensis*, y su conservación en el Parque Nacional Turquino, Granma.

Rodríguez, J. L. Y C. Aguilar (2007). Germination of *Juglans jamaicensis* C. DC. Subsp. *jamaicensis*, in nursery. CFORES.

Alcón, P., J. Ligos, M. A. De Peña, *et al.*, (2009). Evaluación del cultivo *in vitro* de nogal (*Juglans regia* L.) para la proliferación de árboles seleccionados para la producción de madera. In 5to. Congreso Forestal Español. Avila. España: Editores: S.E.C.F. Junta de Castilla y León.

Uribe, M. Y L. Cifuentes (2004). Application of *in vitro* cultivation techniques in the propagation of *Legrandia concinna*.

Avilés, F.(2009). Propagación de material adulto de nogal (*Juglans regia* L.) Vía cultivo *in vitro*. Universidad de Concepción.

Borges, M., D. Reyes, J. Zayas y R. Destrade (2015). Efecto de Pectimorf® en el enraizamiento *in vitro* de plantas de 'FHIA-18' (Musa AAAB). Biotecnología Vegetal, 15(4).

Fors, A. J.(1967). Manual de Selvicultura. Edtion ed. La Habana: INDAF.

Rivera, C., R. García, y. Nieto Y H. Bouza (2011). Autoecología de *Juglans jamaicensis* Subsp *Insularis*. In.: <http://www.monografias.com/trabajos89/autoecologia-juglans-jamaicensis-subsp-insularis/autoecologia-juglans-jamaicensis-subsp-insularis.shtml>.

Pérez, J. y E. Quenta (2015). Germination *in vitro* embryo of Walnut (*Juglans boliviana*). J Selva Andina Biosph.