UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

TESIS DE DOCTORADO

**BIOTECNOLOGÍA FORESTAL APLICADA A LA PRODUCCIÓN
DE MADERA DE NOGAL**

Ricardo Julián Licea Moreno

Madrid, 2016

Universidad Politécnica de Madrid

Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos

Departamento de Biotecnología

Tesis de Doctorado:

Biotecnología forestal aplicada a la producción de madera de nogal

Autor:

Ricardo Julián Licea Moreno

Director:

Luis Gómez Fernández

Doctor por la UPM

Madrid, 2016

Tribunal nombrado por el Magfco. y Excmo. Sr. Rector de la Universidad Politécnica de Madrid, el día de Febrero del 2016.

Presidente:

Secretario:

Vocal:

Vocal:

Vocal:

Suplente:

Suplente:

Realizado el acto de defensa el día de Febrero del 2016

EL PRESIDENTE

EL SECRETARIO

Dream on until your dreams come true

Steven Victor Tallarico

Dedicatoria

A lávor y Annette, mi principal fuente de inspiración: este es mi legado.

A mis padres, como ya hice una vez, os ofrezco esta tesis a modo de ofrenda: esta es la muestra de que vuestras enseñanzas no cayeron en saco roto.

A Iliana y a Nicky: gracias por estar a mi lado, por darme vuestro apoyo en mis “locuras” y servir de acicate para conseguir las.

A mi tía Elda: estés donde estés, sé que has estado pendiente de mí y estarás satisfecha con este resultado.

A mi herma, con su amor infinito, y a mis preciosas sobris.

A mi familia búlgara, incondicionales y que en estos últimos 13 años me acogisteis y me apoyasteis en todo.

Al resto de mi familia, a mis amigos y colegas de todas partes del mundo que servisteis, para bien o para mal, de molde para mi formación personal y profesional.

A mis compañeros de Bosques Naturales S. A.

Agradecimientos

A Bosques Naturales S. A. que financió el 100% de esta investigación. Que me dio la oportunidad de trabajar en un tema tan apasionante. Que nunca me exigió ningún resultado, ni siquiera dedicación. Que nunca se ha inmiscuido en mis investigaciones. Que me dio la libertad suficiente para poner en práctica mis ideas: gracias.

A Luis Gómez Fernández, mi Director de tesis: mi eterno agradecimiento por darme la posibilidad de culminar este viejo anhelo y por todo lo que aprendí de ti.

A Ignacio Urbán Martínez: sin tu apoyo habría sido mucho, mucho más difícil.

A Angela Bibiana Contreras Mogollón: tu nombre merecería estar junto al mío en esta tesis.

A Ana Valeria Morales: que caíste del cielo como un ángel y aún te sigo echando de menos. Tu ayuda fue decisiva para que la micropropagación del nogal en Bosques Naturales S. A. fuera una realidad. Gracias por apoyarme y soportarme.

A todos mis compañeros de Bosques Naturales S. A., que en mayor o menor medida habéis contribuido a alcanzar estos resultados y muchos me habéis secundado en mis ideas, por disparatadas que éstas hubieran sido.

A Julia, Irene y Alvaro, mis otros compañeros del laboratorio 201 del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. En vuestra compañía nunca me sentí incómodo. Me acogisteis como uno más y me transmitisteis todo vuestro conocimiento sin reservas. Si un día pudiera formar un equipo de trabajo seguro que os llamaría.

A Juan José Silva Pupo que me introdujiste en este mundo. A día de hoy tus enseñanzas no han podido ser sustituidas.

A Pedro Pujol Oslé, no se si algún día puedas leer estas líneas, pero igual mi eterno agradecimiento por todo lo que aprendí a tu lado.

A Ezequiel Cabrera Ordoñez, por toda tu ayuda cuando andaba perdido y que fue fundamental para lograr mi primer resultado positivo con el nogal.

A María Luz González (Universidad de Santiago de Compostela) y a Pablo Melendi (Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas): por vuestra paciencia y ayuda en la realización de la histología.

A los que me abrieron las puertas y me ayudaron a desarrollarme. También a los que me las cerraron y me han servido para superarme.

Listado de abreviaturas:

ADN: ácido desoxirribonucleico

AIA: ácido indolacético

AIB: ácido indolbutírico

ANA: ácido naftalenacético

ANDEVA: análisis de varianza

BAP: 6-bencilaminopurina

BES: siglas de *Bacterial Artificial Chromosome End Sequence*

CEE: Comunidad Económica Europea

CFT: Cefotaxima

CRB: Carbenicilina

CLRV: del inglés, *cherry leaf roll virus*

CNR: siglas del *Consiglio Nazionale Delle Ricerche*

CODIS: siglas del *Combined DNA Index System*

DAP: diámetro a la altura del pecho, aproximadamente 1,30 m de altura

DKW: medio de cultivo para nogal desarrollado por Driver y Kuniyuki (1984)

EMBL: siglas de *European Molecular Biology Laboratory*

EST: Estreptomicina

FeEDDHA: etilendiamin di 2-hidroxifenilacetato férrico

FeEDTA: ácido etilendiamintetracético ferroso

GenBank: base de datos perteneciente al *National Center for Biotechnology Information*

GTM: Gentamicina

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

INRA: siglas del *Institut National de Recherche Agronomique*

IRTA: siglas del *Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries*

ISSA: siglas en inglés del *Centro di Ricerca per la Selvicoltura*

LB: del inglés, *Lysogeny Broth*

LSD: del inglés, *Least Significant Difference*

MCM: medio de crecimiento microbiano

MS: medio de cultivo para tabaco desarrollado por Murashige y Skoog (1962)

OD₆₀₀: densidad óptica de una muestra medida con una longitud de onda de 600 nm

PCR: del inglés, *Polymerasa Chain Reaction*

PG: floroglucinol

PID: probabilidad de identidad

PID_{Sib}: probabilidad de identidad entre hermanos

PPFD: del inglés, *Photosynthetic Photon Flux Density*

PPM: del inglés, *Plant Preservative Mixture*

pUC19: plásmido de clonación número 19 diseñado en la Universidad de California

SDS: del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate*

SOC: del inglés, *Super Optimal Broth*

SSC: del inglés, *Salin-Sodium Citrate*

SSR: del inglés, *Single Sequence Repeats*

TBE: mezcla tris-borato-EDTA

TDZ: Tidiazuron

ZEA: Zeatina

WPM: del inglés, *Woody Plant Medium*, medio de cultivo para laurel desarrollado por Lloyd y McCown (1980)

Índice de contenidos

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Lista de abreviaturas	iii
Resumen	1
1. Antecedentes	4
1.1 Comercio de la madera y situación actual de los bosques	4
1.2 Valor de la madera de nogal	6
1.3 Origen, historia y taxonomía de la familia <i>Juglandaceae</i>	9
1.4 El nogal híbrido maderero	10
1.5 Material clonal vs progenies de semilla	11
1.6 Programas de mejora por selección en la familia <i>Juglandaceae</i>	13
1.7 Micropropagación en el género <i>Juglans</i>	18
1.8 Marcadores moleculares	25
2. Objetivos	29
3. Materiales y métodos	30
3.1 Material vegetal	30
3.1.1 Evaluación de la variabilidad existente entre plantaciones de semilla y clonales	30
3.2 Micropropagación	31
3.2.1 Medio de cultivo y condiciones de incubación	31
3.2.2 Saneamiento de material contaminado	33
3.2.3 Introducción y establecimiento <i>in vitro</i> . Ensayos en las fases 0 y 1	34
3.2.4 Multiplicación y pre-acondicionamiento para el enraizamiento. Ensayos en las fases 2 y 3	36
3.2.4.1 Efecto de la densidad de inóculo y la edad del microbrote sobre el crecimiento <i>in vitro</i> y su influencia sobre el enraizamiento	36
3.2.4.2 Determinación de la concentración de sacarosa más adecuada durante la pre-inducción radical	36
3.2.4.3 Efecto de la introducción del Floroglucinol sobre la multiplicación, el enraizamiento y la supervivencia <i>ex vitro</i> de las vitroplantas producidas	36
3.2.4.4 Efecto de la sustitución del FeEDTA por FeEDDHA como fuente de hierro sobre la multiplicación y el enraizamiento	37
3.2.5 Ensayos clonales	38

3.2.6 Análisis histológicos	38
3.2.7 Diseño y análisis estadísticos	38
3.3 Genotipado por medio del uso de marcadores de ADN del tipo SSR	39
3.3.1 Material vegetal y extracción del ADN genómico	39
3.3.2 Condiciones para la PCR y evaluación de los resultados	39
3.3.3 Evaluación del poder discriminante de los microsatélites de la genoteca creada por Woeste <i>et al.</i> (2002) para <i>J. nigra</i> en el híbrido maderero	40
3.3.4 Desarrollo de un set marcadores de tipo SSR específico para el nogal híbrido maderero	41
3.3.4.1 Creación de las genotecas enriquecidas en microsatélites	41
3.3.4.2 Fragmentación del ADN genómico de nogal y ligación de adaptadores S- <i>Bam</i> HI	41
3.3.4.3 Purificación de fragmentos con microsatélites	42
3.3.4.4 Ligado en el vector pUC19	43
3.3.4.5 Transformación de <i>E. coli</i> y preparación de las genotecas	44
3.3.4.6 Evaluación de la calidad de las genotecas	44
3.3.4.7 Secuenciación de microsatélites	44
3.3.4.8 Identificación de los <i>loci</i>	45
3.3.4.9 Diseño de <i>primers</i>	45
3.3.4.10 Optimización de los parámetros para las amplificaciones, selección definitiva de las parejas de <i>primers</i> y genotipado del material seleccionado	45
4. Resultados	47
4.1 Selección y micropropagación de ortetos fenotípicamente superiores	47
4.1.1 Programa de mejora por selección para el nogal híbrido maderero	47
4.1.2 Variabilidad en plantaciones de semilla y plantaciones clonales	55
4.1.3 Micropropagación	60
4.1.3.1 Saneamiento	60
4.1.3.1.1 Uso de la PPM, la Estreptomicina y la Gentamicina	63
4.1.3.1.2 Uso de la Carbenicilina y la Cefotaxima	67
4.1.3.2 Esquema de micropropagación	71
4.1.3.2.1 Introducción y establecimiento <i>in vitro</i>	75

4.1.3.2.2 Multiplicación y pre-acondicionamiento para el enraizamiento. Ensayos en las fases 2 y 3	85
4.1.3.2.3 Efecto de la densidad de inóculo y la edad del microbrote sobre el crecimiento <i>in vitro</i> y su influencia sobre el enraizamiento	85
4.1.3.2.4 Determinación de la concentración de sacarosa más adecuada durante la pre-inducción radical	90
4.1.3.2.5 Efecto del Floroglucinol sobre la multiplicación, el enraizamiento y a supervivencia	92
4.1.3.2.6 Efecto de la sustitución del FeEDTA por FeEDDHA como fuente de hierro sobre la multiplicación y el enraizamiento	96
4.1.3.2.6.1 Variaciones en el pH del medio de cultivo	101
4.1.3.2.7 Efecto de diferentes fuentes de carbono utilizadas durante la expresión radical sobre la rizogénesis y la supervivencia de las vitroplantas	102
4.1.3.2.8 Análisis de los sistemas radicales y foliares formados <i>in vitro</i>	107
4.1.3.2.9 Resultados del protocolo de micropropagación	112
4.1.4 Discusión	123
4.2 Genotipado por medio del uso de marcadores de ADN del tipo SSR	126
4.2.1 Evaluación del poder discriminante de los microsatélites de la genoteca creada por Woeste <i>et al.</i> (2002) para <i>J. nigra</i> , en el híbrido maderero	126
4.2.2 Diseño, optimización y evaluación de un nuevo <i>set</i> de marcadores del tipo SSR	131
4.2.2.1 Diseño de las parejas de <i>primers</i>	133
4.2.2.2 Optimización de los parámetros para la PCR y validación de la metodología	134
4.2.2.3 Genotipado del material seleccionado y determinación del poder discriminante conjunto del <i>set</i> de marcadores	139
4.2.3 Discusión	144
5. Conclusiones	148
6. Referencias	150

RESUMEN

Resumen:

Los nogales son especies pertenecientes a la familia *Juglandaceae*, ampliamente distribuidos por las zonas templadas y subtropicales del planeta. Son apreciados desde la antigüedad por la calidad de sus frutos y su madera. Su grado de domesticación es relativamente bajo comparado con cultivos alimenticios, e incluso respecto a otras especies forestales. Aunque el mercado de la madera de nogal suele mover grandes cantidades de dinero, su producción está basada principalmente en explotaciones extensivas, creciendo bajo sistemas poco tecnificados. Algunos intentos se han realizado en los EUA y Europa para la obtención de variedades madereras de nogal, pero ya sea por sus prolongados ciclos biológicos, por la complejidad genética de los caracteres sobre los que habría que incidir, por la escasa experiencia acumulada en programas de mejoramiento o por las limitaciones de los protocolos comerciales de reproducción asexual disponibles, lo cierto es que no existen genotipos seleccionados y destinados para tal fin.

Poseer la capacidad de reproducir asexualmente los genotipos selectos es el complemento necesario de los programas de mejoramiento genético. Igualmente constituye la base de cualquier sistema productivo intensivo. Los sistemas de propagación vegetativa tradicionales en la familia *Juglandaceae*, además de ser inefectivos para la producción de elevados volúmenes de plantas, implican una gran complejidad en su ejecución y sus resultados suelen ser impredecibles. La micropropagación se plantea como la mejor alternativa para superar las dificultades de estas técnicas. Sin embargo, los nogales son considerados como altamente recalcitrantes al cultivo de tejidos, lo que provoca que sólo muy pocos genotipos sean propagados de forma comercial.

Varias fases de la micropropagación de los nogales son especialmente conflictivas, e inciden de manera individual, y en su conjunto, sobre el resultado final. El control de los contaminantes microbianos, junto con la emisión de sustancias fenólicas y el decaimiento de los cultivos dificultan el establecimiento *in vitro* de la gran mayoría de los genotipos. La re-emergencia de microorganismos durante la proliferación es una fuente de pérdidas importante que también puede conducir al fracaso de la micropropagación. Las bajas tasas de enraizamiento y la elevada mortalidad registrada durante la aclimatación, unidas a factores genéticos, terminan por limitar la utilización comercial de esta tecnología a unos pocos genotipos.

Con el objetivo de desarrollar un protocolo de micropropagación pre-comercial para el nogal híbrido maderero, se incidió en la solución de los principales problemas que

dificultan la definición de ésta como una tecnología funcional para la producción de clones de ortetos selectos, al menos, para aquellos genotipos que pudieron ser establecidos *in vitro*. Así, aquí se presenta una metodología para el establecimiento *in vitro* que reduce la complejidad de esta fase y mejora el porcentaje de éxito durante la introducción. Igualmente se profundizó en el saneamiento de material contaminado y en el desarrollo de una herramienta que sirva para abordar el control de la re-emergencia microbiana durante la proliferación. También se analizan los elementos claves de este protocolo que garantizan la obtención de microbrotes de calidad enraizables, potencialmente capaces de soportar el paso a condiciones *ex vitro*. La evaluación de aspectos como la sustitución del FeEDTA por el FeEDDHA como fuente hierro, la introducción del Floroglucinol en el medio de cultivo de proliferación y la determinación de una fuente de carbono adecuada para la formación de las raíces, junto con un manejo adecuado de la fase previa a la pre-inducción radical, fueron determinantes en la micropropagación de hasta 14 genotipos de nogal híbrido maderero. Adicionalmente, la realización de un análisis detallado del sistema radical permitió comprobar que la metodología propuesta favorece la producción de raíces que están conectadas vascularmente con el tallo, lo que unido a la presencia de estomas morfológicamente normales, permite reducir las pérdidas por estas causas y favorece el proceso de endurecimiento.

Como complemento del programa de mejora y de clonación, se abordó el desarrollo de una herramienta que permitiera identificar y diferenciar las selecciones. Buscando combinar la simplicidad de la técnica con el máximo poder discriminativo posible, se eligió el uso de marcadores genéticos del tipo SSR. En una primera aproximación, se evaluó la conveniencia de emplear *primers* previamente publicados (Woeste *et al.* 2002) y utilizados en varias especies de la familia *Juglandaceae* (Dangl *et al.* 2005, Victory *et al.* 2006, Ross-Davis y Woeste 2008, entre otros autores). A pesar de que la mayoría de las parejas de cebadores evaluadas rindieron productos de amplificación interpretables, su capacidad de clasificación conjunta fue muy reducida y de uso muy limitado en una población afectada por un alto grado de parentesco. Por esta razón fue necesario desarrollar una batería de marcadores microsatélites diseñados específicamente para el nogal híbrido maderero. De las 700 regiones secuenciadas, finalmente 24 parejas demostraron ser funcionales y lo suficientemente polimórficas como para discriminar entre medios hermanos. Al ser utilizadas 10 de las nuevas parejas de *primers*, junto con 2 de la genoteca desarrollada por Woeste *et al.* (2002), en una población diferente fue posible genotipar con una PID del orden de 10^{-11} , lo que abre

la posibilidad de utilizar este *set* de marcadores *de novo* dentro de la familia *Juglandaceae*.

1. ANTECEDENTES

1. Antecedentes

1.1 Comercio de la madera y situación actual de los bosques

La madera es un bien demandado por las sociedades modernas. La gran versatilidad de sus productos ha acompañado el desarrollo del hombre. No obstante el elevado nivel tecnológico alcanzado en los últimos 100 años en la elaboración de materiales artificiales, un recurso natural como la madera continúa siendo insustituible y su comercio y el de sus derivados continúa generando fuente de trabajo y de riqueza.

Los datos más actuales ofrecidos por la Organización Mundial para la Alimentación y la Agricultura (FAO 2014) demuestran que, por cuarto año consecutivo, la producción global de los principales productos de la madera mostró un crecimiento sostenido durante el año 2013 (**Tabla 1**); siendo significativo el incremento del valor de la exportaciones respecto a los años precedentes.

Tabla 1 Producción global y comercio de los productos de la madera durante 2013.

Producto	Unidad	Producción				Exportaciones			
		2013	Cambio (%) con respecto a:			2013	Cambio (%) con respecto a:		
			2012	2000	1980		2012	2000	1980
Madera en rollo	millón de m ³	3591	1%	4%	15%	137	13%	16%	46%
Combustible de madera	millón de m ³	1854	0%	5%	10%	8	2%	129%	
Madera en rollo industrial	millón de m ³	1737	2%	3%	20%	128	14%	12%	38%
Madera aserrada	millón de m ³	413	5%	9%	0%	124	5%	10%	77%
Tableros de madera	millón de m ³	368	8%	92%	253%	77	3%	36%	374%
Hojas de chapa y madera terciada	millón de m ³	146	13%	119%	233%	29	2%	30%	256%
Tableros de partículas y de fibra	millón de m ³	212	5%	77%	269%	49	3%	40%	490%
Pulpa de madera	millón de toneladas	174	0%	2%	38%	58	4%	50%	172%
Pulpa de otras fibras	millón de toneladas	14	-15%	-10%	87%	0	-6%	20%	87%
Papel recuperado	millón de toneladas	215	0%	50%	326%	56	-6%	125%	910%
Papel y cartón	millón de toneladas	398	0%	22%	135%	109	1%	12%	213%
Valor de productos forestales	mil millones US\$					246	5%	70%	334%

Fuente: FAOSTAT-Base de datos forestal. Última actualización 17 de Febrero del 2015.

La utilización de los productos de la madera está asociada directamente al ritmo de la economía mundial. Si la producción global de los derivados de la madera declinó durante la recesión económica del 2008-2009, ésta ha vuelto a aumentar gradualmente en el período 2010-2013, con el inicio del final de la crisis. Sin embargo, ésta no se ha producido con la misma intensidad en todas las regiones, destacando la rápida recuperación en los mercados de Asia-Pacífico, Latinoamérica y el Caribe y América del

Norte; mientras que ha caído en toda Europa, especialmente en el sur y oeste europeo (FAO, 2014).

Aunque el comercio de la madera en Europa se vio afectado por el inicio de la crisis en 2008, a partir del año 2010 se observa una tendencia alcista y sostenida hasta 2014 (**Fig. 1**); período en el que, aun a pesar de la recesión económica, mantuvo su balanza comercial favorable. Por su parte, aunque en España las exportaciones de madera para aserradero entre 2005 y 2014 siguieron un ritmo más o menos estable, el valor de las importaciones cayeron en picado a partir del 2007 hasta alcanzar un mínimo durante 2011, para comenzar un ligero repunte en el 2012, pero muy lejos de las cifras registradas 5 años antes (Eurostat 2015). Estos datos constituyen un claro reflejo de la situación del sector forestal en la península.

Fig. 1 Comercio de maderas para aserradero procedentes de especies no coníferas. En Europa se incluyen datos de Rusia y Turquía. Valores expresados en millones de euros. Datos Eurostat (2015). Última actualización 18-09-2015

Los bosques son fuente de inspiración, belleza y reflexión; de los que depende 1/5 de la población mundial y es fuente de empleo directo para alrededor de 13,2 millones de profesionales y más de 41 millones de personas en el sector informal (Groutel y Alix 2015). Se estima que existen 4000 millones de hectáreas de árboles en el planeta, de los cuales se extrae anualmente más de 3500 millones de m³ de madera, llegando a alcanzar en el 2013 un valor en el mercado de 250 000 millones de dólares, casi el doble de lo logrado en 1998 (Groutel y Alix 2015).

Aunque el ritmo de deforestación a nivel mundial muestra signos de decrecimiento, aún sigue siendo alarmante. Si mientras en el decenio 1990-2000, 16 millones de hectáreas de superficie forestal se convirtieron anualmente a otros usos o fueron perdidas por causas naturales, del 2000 al 2010 ésta solo se redujo a 13 millones de hectáreas por año. Los niveles de deforestación y reforestación son desiguales por regiones, sin embargo la plantación de árboles a gran escala ha reducido la tasa de pérdida de superficie forestal neta global (FAO 2010).

El balance entre lo que se planta y/o regenera de forma natural y las pérdidas es aún muy desfavorable (FAO 2010); planteándose como una necesidad imperiosa la ejecución de planes nacionales, regionales y globales de reforestación para de esta forma incrementar las plantaciones selvícolas. Estas acciones no solo conducirían a la recuperación de la superficie ocupada por árboles sino que sus efectos indirectos tendrán una amplia repercusión social y en la conservación de los recursos naturales.

España, en el período 2000-2010, poseía un 36,0% del territorio nacional ocupado por bosques (algo más de 18 millones de hectáreas), un 45,0% por debajo de la media europea. A pesar de que la tasas de cambio anual de áreas boscosas son superiores al conjunto del resto de los países europeos, ésta se vio reducida de un 2,09%, durante 1990-2000, a un 1,0% en el quinquenio 2005-2010, con un mínimo significativo de 0,36% entre el 2000 y el 2005. Llamativa es también la no existencia de bosques primarios; correspondiendo un 85,0% de la superficie boscosa española a bosques regenerados y solo un 15,0% a bosques plantados (más de 2,5 millones de hectáreas) (FAO 2010).

En España, el aumento del consumo de madera en la década de 1990 provocó un incremento paralelo de las importaciones: al mantenerse estable la producción, la balanza comercial se vio seriamente perjudicada (**Fig. 1**). Si bien es conocido que las crisis económicas ralentizan el comercio de la madera y sus derivados, es imprescindible crear las condiciones necesarias para la protección de los recursos forestales naturales existentes, por medio de iniciativas público-privadas destinadas a

la creación y fomento de plantaciones altamente productivas, no solo de especies de crecimiento rápido sino también de aquellas de ciclos más largos pero que ofrecen una madera de mayor calidad y mayor valor comercial (FAO 2010).

1.2 Valor de la madera de nogal

Recopilar información sobre el valor de la madera de nogal resulta un tanto laboriosa pues es un mercado muy disperso, en el que no siempre coinciden geográficamente la producción de la materia prima y el consumo industrial. Por otra parte, la demanda es reducida y poco homogénea en sus exigencias frente a otras caducifolias.

Fig. 2 Diferentes aplicaciones y productos elaborados a partir de la madera de nogal

Hasta finales del siglo XX la producción de madera se encontraba por debajo del consumo interno, cubriendo sólo un 60,0% de las necesidades globales. El mayor volumen de producción correspondía a las coníferas, principalmente madera de pino.

Por su parte las frondosas estaban representadas básicamente por madera de roble, haya, castaño y chopo (FAO 2010).

En el mercado de la madera de frondosas es vital poder distinguir entre madera para chapa y para aserrar. Por ejemplo, en los EUA, Alderman *et al.* (2010) estiman que la primera puede llegar a costar 2 a 10 veces más que la segunda. En general, según estos mismos autores es aceptado que los troncos para chapa deben estar libres de nudos, sin distorsiones en la corteza y sin perforaciones provocadas por larvas y/o pájaros carpinteros. Sin embargo, desde el punto de vista de una selvicultura intensiva, los fustes deben ser rectos y cilíndricos, con las vetas rectas, libres de contaminaciones metálicas, con el corazón (duramen) centrado, de coloración homogénea y anillos uniformemente espaciados (Wiedenbeck *et al.* 2004). Wiedenbeck *et al.* (2004) y Phelps *et al.* (2007) coinciden en que, entre otras características indeseables, grandes cantidades de albura deprecian el valor de la madera de nogal.

La madera de nogal es muy apreciada y demandada por su calidad. Phelps *et al.* (2007) afirman que aunque ésta posee buenas propiedades mecánicas y físicas, es valorada fundamentalmente por sus características estéticas; poseyendo múltiples usos en ebanistería para la elaboración de muebles y bisutería, fabricación de tableros alistonados y de chapa, recubrimiento de suelos, construcción de instrumentos musicales, así como otras muchas aplicaciones (**Fig. 2**).

En el mercado español, el precio de la madera importada de nogal en rollo, ya sea europeo o americano, oscila entre los 600 y 2400 €/m³ (Peraza *et al.* 2004). Por su parte, el nogal nacional sin defectos, destinado a ebanistería podría llegar a cotizarse entre 300 y 750 €/m³ (indagaciones entre proveedores, almacenistas y receptores).

Según Wiedenbeck *et al.* (2004), en 2002 España se encontraba entre los cinco principales importadores de chapa de madera de frondosas fabricada en los Estados Unidos. Lo que constituye en reflejo de la importancia del sector español de transformación de la madera, pero que no posee su reflejo en el sector forestal.

1.3 Origen, historia y taxonomía de la familia Juglandaceae

Los nogales pertenecen a la familia *Juglandaceae*, una de las 8 del orden *Fagales*. Esta agrupa a varios géneros de gran importancia económica no solo por producir frutos de excelente calidad sino también por su madera. Las formas ancestrales de nogal se distribuyen por Europa, Asia y América hasta el norte de Alaska. Factores climáticos y antropogénicos han influido y alterado su distribución geográfica, resultando en las 21 especies de *Juglans* existentes hoy en día (McGranahan y Leslie 2009).

Basado en un detallado estudio de la biología de la familia, Manning (1978) propuso dividir la familia *Juglandaceae*, en dos subfamilias, la *Platycaryoideae* y la *Juglandoideae*. Esta última la separó en las tribus *Juglandae* y *Engelhardidae*; estando en la primera agrupadas en 4 secciones todas las especies conocidas como nogales: la *Juglans* (representada únicamente por *J. regia* L.); la *Rhysocaryon* (están agrupados los nogales del continente americano, destacando por su importancia económica *J. nigra*, *J. major*, *J. hindsii*), la *Cardiocaryon* (aquí se ubican los nogales japoneses y algunos chinos) y la *Trachycaryon* (se sitúa solamente *J. cinerea*).

Numerosos estudios posteriores han incorporado caracteres bioquímicos y genéticos, provocando una reorganización taxonómica de la familia, aunque los detalles fundamentales se mantienen más o menos inalterables. La última organización encontrada (Manos y Stone 2001) ofrece la siguiente distribución. Se mantiene la subfamilia *Juglandoideae* pero la *Platycaryoideae* es sustituida por la *Engelhardoidae*, que anteriormente era clasificada como la tribu *Engelhardidae*. Por su parte la subfamilia *Juglandoideae* se subdivide en dos tribus *Platycaryae* y *Juglandae* y ésta última quedaría formada por 2 subtribus: *Juglandinae* (géneros *Juglans*, *Pterocarya* y *Cyclocarya*) y *Carynae*. Respecto a las secciones del género *Juglans*, existe más o menos unanimidad respecto a las señaladas por Manning (1978). Sin embargo, autores como Aradhya *et al.* (2006) y Aradhya *et al.* (2007), quienes realizaron estudios filogenéticos basados en marcadores de ADN, sugieren la siguiente organización: la sección *Trachycaryon* es situada dentro de la *Rhysocaryon*, por lo que pasaría a llamarse sección *Rhysocaryon – Trachycaryon*. Otro cambio importante es que ubican a una especie muy emparentada con *J. regia*, y que se localiza únicamente en el sudeste de China y el Tíbet (*J. sigillata*, nuez de hierro), en la misma sección que ésta, la *Juglans*.

Los progenitores del híbrido madero pertenecen a secciones bien diferenciadas, con distribuciones geográficas únicas, probablemente afectadas por factores evolutivos diferentes (Aradhya *et al.* 2006, Aradhya *et al.* 2007), lo que podría constituir una ventaja al reunir en un híbrido genomas que, hasta cierto punto, se han desarrollado de forma independiente: mientras que *J. major* está distribuida en el suroeste de los EUA y el noroeste de México, *J. regia* ocupa poblaciones naturales en los Balcanes, norte de Irán, Turquía, la región sur del mar Caspio, Asia central, China y zonas del Himalaya (Aradhya *et al.* 2006).

Los nogales son especies monoicas, afectadas por dicogamia, en este caso, generalmente afectadas por protoginia. Debido a este fenómeno existen pocas posibilidades de autofecundación, teniendo que recurrir los nogales a la fecundación cruzada para su reproducción (Pijut 1997, Michler *et al.* 2007). Desde el punto de vista

de la producción comercial de frutas la dicogamia constituye un inconveniente al tener que plantar variedades polinizadoras que garanticen la fecundación de las flores femeninas, de hecho la obtención de variedades protrándicas constituye un objetivo en algunos programas de mejoramiento de nogal (Michler *et al.* 2007). Sin embargo cuando se trata de producir semillas destinadas a programas de mejoramiento o simplemente para su plantación directa existen pocas probabilidades de encontrar semillas autofecundadas, lo que garantiza disponer de una descendencia híbrida en un alto porcentaje, que porta un genoma compuesto por los padres que intervienen en el cruzamiento.

1.4 El nogal híbrido maderero

El nogal híbrido maderero es de origen francés y es el resultado del cruce entre *J. major* (Torrey) Heller var. 209 (Mj209) y *J. regia* L. (Ra). Según Aletà y Vilanova (2006), el progenitor femenino Mj209, no se sabe exactamente a qué especie pertenece. Inicialmente se le consideró un *J. nigra*, posteriormente se volvió a clasificar como *J. major* y en la actualidad se tiende a pensar que él mismo es un híbrido, pero con capacidad productiva. El híbrido Mj209xRa también es conocido como *Juglans* x intermedia.

De acuerdo a los resultados de ensayos de campo realizados por en el IRTA, el híbrido Mj209xRa tiene una aptitud forestal mayor que el nogal europeo pero menos que los nogales negros americanos. En España, esta es una de las progenies más utilizadas debido a su gran capacidad de adaptación a las zonas de suelos alcalinos y a las áreas cálidas de la Península Ibérica (Aletà y Vilanova 2006). Las primeras plantaciones a partir de híbridos en Francia datan de los años 70. Por su parte, en España, éstas se comienzan a realizar a finales de los 90 del siglo XX, contabilizándose en 2005 unas 2500 ha de nogal forestal, de las que más de la mitad corresponden a nogales híbridos (Aletà y Vilanova 2006).

El nogal híbrido maderero se caracteriza por poseer una dominancia apical marcada, lo que le confiere una buena aptitud forestal, así como un tronco más recto que el nogal europeo (Paris *et al.* 2001, Aletà y Vilanova 2006). Igualmente posee un vigor bastante acusado, demostrando tener mejores crecimientos que el nogal europeo y el híbrido Ng23 (*J. nigra* var. 23 x *J. regia*) en estudios comparativos en España (Vilanova y Aletà 2005, Vilanova *et al.* 2011), Italia (Paris *et al.* 2001) y el Reino Unido (Clark y Hemery 2010). Aunque suele tener problemas con una emisión excesiva de chupones y una producción de ramas muy gruesas, éstos defectos se pueden controlar con una correcta poda y manejando la densidad de plantación. Un carácter de gran valor asociado a las

descendencias del híbrido Mj209xRa es que, en general, suelen ser de brotación tardía, convirtiéndolas en progenies muy adecuadas para regiones meridionales y/o donde son frecuentes las heladas tardías en primavera.

Aunque el híbrido *Juglans* x intermedia podría no corresponder a una verdadera F1 (Aletà y Vilanova 2006), algunos hechos sugieren lo contrario. Si bien es cierto que un porcentaje considerable de la población de semilla no es apto para la explotación intensiva (datos no publicados, basados en la experiencia acumulada en Bosques Naturales), este hecho no parece estar asociado a la aparición de *loci* recesivos, típico de una población segregante (F2 en adelante), si no a factores ambientales como tipo y profundidad del suelo, disponibilidad de agua, entre otros factores. Así, existen zonas con condiciones edafoclimáticas más adecuadas para el cultivo del nogal en las que el porcentaje de potenciales árboles plus es mayor que en otras con características menos favorables. Por otro lado el manifiesto vigor de las selecciones clonales y sus correspondientes ortetos, hacen pensar en que, en efecto la progenie objeto de estudio podría corresponder a un híbrido F1. Al respecto, Woeste y McKenna (2004), citando a Bey (1969), señalan que la mayor parte de la primera generación (F1) de los cruzamientos interespecíficos en el género *Juglans* se caracterizan por mostrar un dramático vigor híbrido.

1.5 Material clonal vs progenies de semilla

La homogeneidad en el crecimiento de una plantación es un comportamiento muy valioso cuando se pretenden obtener árboles de características dimensionales y conformacionales uniformes. La falta de homogeneidad entorpece la toma de decisiones en la gestión silvícola: necesidad de marcar diferentes ritmos de poda y dificultades para aplicar claras sistemáticas. También complica la fijación de la edad o turno de explotación, el establecimiento de lotes y la valoración del producto final.

Las plantaciones de semilla del nogal híbrido maderero poseen una variabilidad muy acusada a pesar de ser árboles con un alto grado de parentesco (Aletà y Vilanova 2006), existiendo una gran heterogeneidad de comportamiento para la mayoría de los caracteres morfológicos de importancia económica: diámetro, altura, hábito de crecimiento, ramificaciones, respuesta a la poda, así como diversos componentes relacionados con la calidad de la madera (**Fig. 3**).

La alternativa actual más ventajosa para resolver la falta de uniformidad sería el establecimiento de plantaciones clonales. Las plantaciones de nogal negro injertadas

Fig. 3 Características presentes en plantaciones de nogal de semilla y variaciones presentes en la forma y rectitud del tronco (a y b), respuesta a la poda y emisión de chupones (c, d, k), presencia de ramificaciones gruesas (tenedores) (e), acumulación de duramen (f-i) y coloración de la madera (j). (l) Fotograma de una plantación clonal, destacando su uniformidad en el crecimiento

han demostrado transmitir muchas de sus características a sus descendencias clonales

(Woeste y McKenna 2004). Aunque se ha reportado el control genético para algunos caracteres en el nogal híbrido maderero, el factor ambiental ejerce una gran influencia sobre el comportamiento de éstos (Merlo *et al.* 2013). Los efectos del ambiente sobre el crecimiento y comportamiento de los árboles y las plantaciones tendrán que ser necesariamente evaluados por medio del establecimiento de ensayos a largo plazo utilizando selecciones clonales, preferentemente autoenraizadas en un número suficientemente grande de sitios de manera que la varianza dentro de la región puede ser determinada. Los clones autoenraizados serían además particularmente valiosos como controles en ensayos de progenie para cuantificar el efecto de los bloques y localidades, determinar la plasticidad fenotípica y para valorar los efectos de varias técnicas de gestión (Woeste y McKenna 2004).

La heterogeneidad de las plantaciones de semilla contrasta con la uniformidad encontrada en las clonales. Las técnicas convencionales de propagación vegetativa (injertos, enraizamiento de estacas, entre otras) han sido utilizadas tradicionalmente para la reproducción de genotipos valiosos, sin embargo son de difícil ejecución y comercialmente impracticables en el nogal (McGranahan *et al.* 1987, Rink 1990, Pijut 1997, Britton *et al.* 2007). Mientras que las técnicas de cultivo de tejido se convierten en una alternativa promisorio para la clonación (Driver y Kuniyuki 1984, McGranahan *et al.* 1987), el alto grado de recalcitrancia de los nogales y los escasos resultados publicados, en comparación con otras familias, han dificultado el escalado comercial y el máximo aprovechamiento de esta tecnología. En capítulos posteriores se analizará con más detenimiento la evolución del uso del cultivo *in vitro* en el género *Juglans*.

La conveniencia de la utilización de material clonal no sólo se refiere al aspecto productivo. Por ejemplo, Beineke *et al.* (1991) indicaron que las progenies clonales injertadas de nogal negro eran superiores a las poblaciones naturales de semilla, basados en la comparación de estimados de la heredabilidad de algunos caracteres. Por su parte Woeste y McKenna (2004), apuntaban que los árboles autoenraizados eran superiores a los injertados para ciertos tipos de test genéticos debido a que la raíz y el tallo de las primeras eran genéticamente idénticos.

1.6 Programas de mejora por selección en la familia Juglandaceae

A pesar de que la variabilidad fenotípica encontrada en las poblaciones de semilla del híbrido Mj209xRa es un inconveniente para la producción intensiva de madera, sí constituye una gran oportunidad para practicar selección sobre los árboles con características promisorias. Muchos de los ortetos seleccionados tendrían la posibilidad de convertirse en futuras variedades madereras, e incluso, debido a su gran vigor,

podrían ser destinadas para otros fines, como pueden ser su posible uso como portainjertos.

Con el inicio y desarrollo de la Revolución Verde, quedó evidenciada la necesidad de utilizar genotipos selectos en una producción agrícola intensiva (Khush 2001, Evenson y Gollin 2003). Aunque esta es una realidad para muchos cultivos alimenticios e industriales, menos avances existen en el sector forestal (Leaky y Newton 1993). Los nogales, a pesar de poseer una amplia distribución por todo el planeta y rendir muchos productos de gran utilidad, poseen un bajo grado de domesticación (Michler *et al.* 2007) y sus métodos de explotación son en general muy tradicionales (Fady *et al.* 2003, Jacobs y Davis 2005). En una encuesta realizada a los viveristas productores de especies forestales de maderas nobles (cerezo, nogal y roble) del Este de los EUA, quedó al descubierto que sólo el 6,8% de las plantas de estas especies provienen de materiales mejorados, contrastando con el 36,0% de las coníferas (Jacobs y Davis 2005).

Varios autores hacen referencia a que casi todos los esfuerzos de mejoramiento genético en la familia *Juglandaceae* han sido destinados a la producción de fruta y no a la de madera (Aletà 2004, Woeste y McKenna 2004, Michler *et al.* 2007).

Indiscutiblemente, es en los EUA donde se acumula la mayor cantidad de experiencia sobre cómo conducir un programa de mejoramiento destinado a la producción de madera de nogal. No obstante, el largo ciclo biológico y productivo de la especie, además del mal planteamiento de muchos de los ensayos allí existentes, han dificultado alcanzar los objetivos propuestos y obtener información más detallada sobre la genética de los caracteres de importancia económica (Woeste y McKenna 2004). Por ejemplo, la más importante colección de nogales injertados, compuesta por centenares de árboles seleccionados para la producción de madera se encuentra en la Universidad de Purdue (Indiana, EUA), sin embargo las salidas potenciales y conclusiones de este ensayo se ven entorpecidas por no estar establecido bajo un diseño adecuado (Woeste y McKenna 2004).

Por su parte, Fady *et al.* (2003) apuntaban que como ningún programa de mejoramiento para calidad de la madera se había puesto en marcha en Europa, el material vegetal provenía de los cultivares para fruta conocidos por alguna adaptación excepcional, el crecimiento o rasgo arquitectónico relevante. Sin embargo Jay-Allemand *et al.* (1996) señalaban que ya desde inicios de la década del 80 del pasado siglo algunos esfuerzos comenzaban a realizarse en éste sentido en Francia por medio de la creación de un grupo de trabajo auspiciado por el *l'Institut pour le Développement Forestier* (IDF). De

acuerdo a estos mismos autores, en la década siguiente varios programas de investigación en fisiología y genética estaban en funcionamiento en la CEE en el INRA (Francia), el IRTA (España), así como en Italia por medio del CNR y el ISSA.

En 1992 fue estructurado un proyecto (AIR3 CT92-0142) dedicado principalmente al estudio de los nogales para la producción de madera, que finalmente comenzó a funcionar a principios de 1993, tras su aceptación por la CEE. La iniciativa implicaba a 19 institutos y 31 unidades de investigación distribuidas en España, Italia, Grecia, Alemania, Bélgica y Francia. Estos programas ponían su atención, además de en *J. regia*, en otras especies como *J. hindsii*, el híbrido "Paradox" (*J. hindsii* x *J. regia*), así como las descendencias de los cruces entre *J. nigra* x *J. regia* y *J. major* x *J. regia* (Jay-Allemand *et al.* 1996).

Igualmente, en Gran Bretaña se desarrollaron sendos programas de mejoramiento para madera utilizando selecciones de nogales negros americanos (Russell y Hemery 2004) y de nogales europeos (Hemery 2004, Clark y Hemery 2010). Todos los resultados de los programas británicos están agrupados en una iniciativa sin ánimos de lucro denominada *Future Trees Trust* (<http://www.futuretrees.org/about-us>) que funciona con el doble papel de organismo asesor científico y de conexión con el sector industrial.

En el ámbito nacional español, concretamente en el IRTA, se inició un proyecto que pretendía incrementar la variabilidad genética de su programa de mejoramiento, basado hasta el momento en el nogal europeo (Aletà 2004). Así comenzó un trabajo paciente de cruzamientos interespecíficos controlados entre nogales negros americanos y europeos, en los que se valoraba fundamentalmente la capacidad de obtención de cruces exitosos, así como ponía énfasis en las características de crecimiento de las descendencias. En 2004 se evaluaron 15 de esas progenies de hermanos completos de cruces entre *J. nigra* var. 23 x *J. regia* y *J. major* var. 209 x *J. regia*, quedando demostrado que los híbridos eran superiores al resto de las descendencias (Aletà 2004).

Existen pocas referencias sobre la ganancia potencial que se obtendría por selección en el caso del nogal; lo que sí es indudable es que, debido al poco grado de domesticación del género, las mejoras podrían ser considerables. En la Universidad de Purdue, por ejemplo, 72 árboles de los 427 seleccionados demostraron estar por encima de la media y ser genéticamente superiores; si esos valores se mantuvieran, significaría que de cada 100 individuos seleccionados 17 serían genéticamente superiores (Woeste y McKenna 2004). Tomando estos datos como referencia, si se partiera de una población lo suficientemente grande, que permita incrementar la presión de selección quizás se podría aumentar el porcentaje de éxito, pero ello implicaría desechar árboles

valiosos para alguna característica concreta, una disyuntiva a la que se enfrentan todos los mejoradores.

Woeste y McKenna (2004) señalan que más allá del diámetro y la altura, el resto de las características de interés, como el porcentaje de duramen, la capacidad de autopoda, la cicatrización de las heridas de poda, la dominancia apical y la rectitud del tronco, son difíciles de cuantificar.

Varios autores han hecho estimaciones sobre la heredabilidad (h^2) de varios de estos caracteres de importancia económica en varias especies de nogal, como la altura (Bey y Williams 1974, Rink y Clausen 1989, Beineke *et al.* 1991, Woeste 2002, Aletà *et al.* 2004, Díaz y Fernandez-Lopez 2005), el diámetro (Beineke *et al.* 1991, Aletà *et al.* 2004, Díaz y Fernandez-Lopez 2005), el área y el porcentaje de área de duramen (Woeste 2002), la rectitud del tronco (Bey y Williams 1974), la foliación y la defoliación, el número de tenedores o bifurcaciones, el ángulo de inserción y el número de ramas (Beineke 1974). En general las h^2 s encontradas son moderadas y están estrechamente asociadas a la edad de los árboles. Estos resultados, sugieren, por un lado, que existen grandes posibilidades de obtener alguna ganancia por selección y, por el otro, plantean la necesidad de determinar el comportamiento de varios genotipos en condiciones edafoclimáticas contrastantes.

Pocos estudios sobre la genética de otros caracteres de importancia también han sido realizados, quizás por la dificultad que entraña su evaluación y por la inexistencia de métodos objetivos de cuantificación. Díaz y Fernandez-Lopez (2005), por ejemplo, determinaron que para el nogal europeo, las variables fenológicas (cantidad de ramas y dominancia apical) estuvieron muy influenciadas por la ubicación de los ensayos. Justamente, estas dos variables que están asociadas con el manejo (densidad de plantación, vegetación acompañante, tipo de poda, entre otros factores) deben ser analizadas de manera muy concienzuda en cada situación concreta; ocupando en un sistema de selección ponderativo un peso menor que otros caracteres.

En el caso del híbrido Mj209xRa, Merlo *et al.* (2013) comprobaron que la elipticidad, la esbeltez y la conicidad del tronco están influenciados por el genotipo, no siendo así sobre el diámetro medio de las ramas, el ángulo de inserción de éstas, la rectitud del tronco y la tonalidad gris de la madera, factores éstos sobre los que la ubicación dentro de la parcela acaparó casi el total de la varianza calculada.

Un importante objetivo de mejora para cualquier programa de mejoramiento, está relacionado con la tolerancia a factores bióticos. La implicación de los daños causados por plagas y enfermedades sobre la productividad hace que este sea en muchos casos

objetivos exclusivos de mejoramiento. En nogal, suele hacerse esfuerzo generalmente en la evaluación de plagas del suelo, precisamente por el hecho de dedicarse mucha atención al desarrollo de patrones de injerto, vigorosos y resistentes a éstas. Especial dedicación recibe la evaluación de la reacción al ataque de *Armillaria mellea*, *Phytophthora*, nemátodos y *Agrobacterium tumefaciens*, entre las más importantes (Leslie y McGranahan 2004, Britton *et al.* 2007, Baumgartner *et al.* 2013). Reid *et al.* (2004) recalcan la necesidad de evaluar la susceptibilidad de los cultivares para fruta a la antracnosis, provocada por el hongo (*Gnomonia leptostyla* [Fr.] Ces. & De Not.). Mientras que, Aletà y Vilanova (2011) también señalan que es recomendable en progenies clonales determinar la reacción al CLRV.

La resistencia a factores abióticos también está incluida en muchos programas de mejoramiento genético (Chinnusamy *et al.* 2005, Vinocour y Altman 2005, Tardieu y Tuberosa 2010), sin embargo, a pesar de que Britton *et al.* (2007) lo señalan como un objetivo prioritario, no se han encontrado referencias al respecto para los nogales. Es probable que el desarrollo de las técnicas de micropropagación y la disponibilidad de muchos genotipos en el futuro pueda hacer factible abordar tan importante aspecto.

El objetivo principal de un programa de mejora es desarrollar organismos con características superiores y que cumplan con el propósito con el que éste se puso en funcionamiento. Entre las disyuntivas a las que se enfrentan los mejoradores se encuentra establecer a qué presión de selección deberá someterse la población objeto de estudio. Una presión demasiado alta permitiría un refinamiento máximo, teniendo como resultado final el menor número posible de individuos con una calidad genética, en principio, superior. Sin embargo, considerando el factor modulador del ambiente, es bastante probable que se termine por discriminar organismos valiosos y que, en algunos casos, el resultado final sea seleccionar individuos para condiciones tan concretas que al pasar a las pruebas de adaptabilidad se compruebe que el objetivo del programa no ha sido cumplido. Por otro lado, presiones muy bajas provocaría trabajar con muestras poblacionales tan grandes que reduciría la objetividad del proceso de selección, culminando igualmente con el fracaso del programa, incurriendo además en gastos excesivos que terminarían por condenar su viabilidad.

Una vez que la madurez de los nogales es muy prolongada, los estudios genéticos en esta especie tienen que ser necesariamente de larga duración. Condicionados por estos factores, Woeste y McKenna (2004) recomiendan que los programas de mejora deberían incluir tantos genotipos o familias como sea posible con el objetivo de que las diferencias encontradas sean avaladas estadísticamente, para así reducir el riesgo de

incluir muchos individuos de escasa calidad genética y, en última instancia, evitar el fracaso del programa.

En rodales naturales, el nogal no suele crecer en grandes extensiones, sino que lo hace de manera interrumpida lo que complica el establecimiento de parcelas experimentales para su análisis. Por lo que contar con bloques experimentales en sitios adecuados para el crecimiento del nogal, además de necesario, suele ser muy difícil.

Como normalmente la extensión de los ensayos con especies forestales es relativamente grande, es frecuente tener que lidiar con los efectos adversos causados por la heterogeneidad del terreno. En estos casos suele recurrirse a la utilización de parcelas de un solo árbol (Rink y Clausen 1989, Woeste y McKenna 2004). Si bien este método suele ser adecuado para la estimación de parámetros genéticos, no es efectivo para la selección individual de árboles (Rink y Clausen 1989). Por otro lado, cuando se pretende determinar los mejores individuos en un programa de selección la mejor opción es utilizar un diseño de bloques completos al azar con cuatro a seis bloques y cuatro plantas por familia en cada bloque (Woeste y McKenna 2004). De acuerdo a estos mismos autores este tipo de diseño también es útil en estudios de interacción genotipo-ambiente, en caso de incluir unos pocos genotipos. En los casos en que se incluyan más de 10 genotipos en los ensayos, Aletà y Vilanova (2011), recomiendan utilizar diseños de bloques incompletos. En cualquier caso, escoger terrenos uniformes es un requisito fundamental previo al montaje de los ensayos de campo para una especie como el nogal tan sensible a las variaciones del suelo (Rink y Clausen 1989).

Un elemento importante fue señalado por Rink y Clausen (1989), quienes proponen que la mejor estrategia para el mejoramiento del nogal debe ser seleccionar aquellas familias que más consistentemente rápido crecen aun en detrimento de sacrificar ganancias en el desarrollo pues no siempre los árboles con crecimientos más estables son los que más rápido lo hacen. En otras palabras, esto significaría seleccionar para una adaptabilidad más amplia. La otra alternativa sería seleccionar genotipos para sitios muy concretos. Sin embargo esta última estrategia tiende a ser un poco reduccionista para un programa de mejoramiento.

1.7 Micropropagación en el género Juglans

El término recalcitrante es ampliamente utilizado en la literatura para definir la incapacidad de las células, órganos y tejidos vegetales para responder a las técnicas de cultivo de tejido (Benson 2000). Por lo tanto el éxito de cualquier protocolo de micropropagación depende en gran medida del grado de recalcitrancia de la especie con la que se trabaje.

Los nogales son considerados especialmente recalcitrantes al cultivo de tejidos (Driver y Kuniyuki 1984, McGranahan *et al.* 1987, Rodríguez *et al.* 1989, Jay-Allemand *et al.* 1992, Britton *et al.* 2007). Igualmente su respuesta a las técnicas convencionales de propagación vegetativa es escasa, limitando su aprovechamiento comercial (Pijut 1997, Günes 1999). A pesar del gran interés que genera la madera de nogal y la calidad de su fruto, no fue hasta los inicios de la década del 80 del siglo XX cuando comienzan a aparecer los primeros reportes importantes sobre el cultivo *in vitro* en el género *Juglans*. La primera comunicación de la micropropagación exitosa a partir de segmentos nodales fue realizada por Chalupa (1981) citada por McGranahan *et al.* (1987). A partir de este momento, varios trabajos fueron publicados, en los que se utilizaban las formulaciones más comúnmente usadas en aquellos momentos: MS (Murashige y Skoog 1962), B5 (Gamborg *et al.* 1966), White (1963), WPM (Lloyd y McCown 1980), entre otras; sin embargo el aprovechamiento de los mismos estuvo muy limitado. Driver y Kuniyuki (1984) publican una formulación específica para la micropropagación del nogal Paradox (DKW), que se ha convertido en la más utilizada hasta la fecha para las especies del género *Juglans*.

Un protocolo de micropropagación *in vitro* implica no solo la obtención de cultivos asépticos y vigorosos y el incremento del volumen del material vegetal sino también la re-adaptación de las vitroplantas producidas a las condiciones fuera del laboratorio. En dependencia de la especie, estas etapas pueden ser más o menos complejas; exigiendo en muchos casos modificaciones en la composición del medio de cultivo y en el manejo de las condiciones físicas de la incubación.

Debergh y Read (1991) describieron varias etapas o fases básicas de la micropropagación. Según estos autores la primera es la fase 0, sobre la que existe más o menos consenso de qué es importante y, en algunos casos, indispensable para el desarrollo de un esquema de micropropagación realizable y repetible. De acuerdo a estos autores, los objetivos de la fase 1 no deben ser muy ambiciosos y debe centrarse en la obtención de cultivos axénicos y viables. La fase 2 debe estar encaminada a la proliferación pero sin comprometer los objetivos de las fases siguientes, la 3 (la producción de plántulas), la 4 (restablecimiento en el invernadero) y la obtención de plantas funcionales.

Los principales problemas en los inicios de la micropropagación de los nogales, como un género recalcitrante, se centraban en (1) el mantenimiento de cultivos viables durante largos periodos de tiempo, (2) la contaminación microbiana, (3) la obtención de respuestas morfogénicas inadecuadas y (4) el colapso de los cultivos, *a priori*, por causa de la emisión de sustancias fenólicas, entre los más importantes.

Como se señaló anteriormente, en 1984, Driver y Kuniyuki publican la primera formulación específica para nogal con la que resuelven varias de las limitaciones antes mencionadas, iniciándose un nuevo camino en la micropropagación del género *Juglans*. Con esta formulación Driver y Kuniyuki (1984) lograron no solo incrementar el crecimiento de los explantes, sino que también solucionaron el gran inconveniente del decaimiento con los subcultivos sucesivos y, de paso, mejoraron el enraizamiento y la supervivencia durante la aclimatación. Según McGranahan *et al.* (1987), el DKW es una modificación del WPM, publicado en 1980 para el cultivo del laurel de la montaña por Lloyd y McCown. Luego de la salida del DKW, McGranahan *et al.* (1987) realizaron una corrección de su formulación original, debida básicamente a errores tipográficos en los contenidos de K_2SO_4 , Na_2EDTA y mio-inositol, así como a la ausencia del $NiSO_4$. A pesar de que la concentración de ésta última sal es relativamente baja ($0,02\mu M$) parece ejercer un efecto beneficioso sobre el desarrollo de los cultivos, resultando llamativo que empresas suministradoras de reactivos no la incluyan en sus productos comerciales (D0246, Duchefa Biochemie).

Los nogales parecen ser bastante exigentes a las condiciones químicas del medio en que son cultivados. Desde la aparición del DKW, casi ninguna otra formulación ha sido utilizada con éxito. Por ejemplo, Revilla *et al.* (1989) lograron reducir la emisión de exudados de los explantes sustituyendo el medio de cultivo MS por el DKW. Igualmente, Dolcet-Sanjuan *et al.* (2004), en un estudio comparativo entre varias formulaciones, demostraron la superioridad del DKW sobre WPM y el MS. No obstante, algunos resultados han demostrado la conveniencia en la utilización de la formulación MS. Bosela y Michler (2008) evaluaron la conveniencia de la utilización de los medios MS, DKW y WPM, así como una reducción al 50,0% del DKW, concluyendo que las variantes bajas en sales (WPM y $\frac{1}{2}$ DKW) no fueron adecuadas para el cultivo *in vitro* de *J. nigra* L. En este sentido, varios investigadores, como Navatel y Bourrain (2001) emplean el medio MS durante todo el proceso de la rizogénesis. Una alternativa diferente fue usada por Ashrafi *et al.* (2010) y Cheniany *et al.* (2012), quienes utilizaron el procedimiento descrito por Vahdati *et al.* (2004), en el que reemplazan el DKW durante la pre-inducción radical por el medio MS, para volver al DKW en la fase de elongación de las raíces; lo que a primera vista, y desde el punto de vista del establecimiento de una producción comercial, podría constituir un inconveniente.

El primer gran inconveniente que deben enfrentar los que intentan hacer cultivo de tejidos de nogal es lograr el establecimiento *in vitro*. La utilización de una fuente de explante u otra, define en gran medida el resultado final del proceso de introducción. Existen varios protocolos de desinfección de material de origen sexual y en principio no

parecen entrañar grandes problemas (Revilla *et al.* 1989, Jay-Allemand *et al.* 1992, Dolcet-Sanjuan *et al.* 2004). Sin embargo, éstos no son de utilidad cuando se trata de clonar árboles creciendo en condiciones de campo. Preservar la identidad genética de ortetos con características valiosas es un punto básico de la micropropagación. Esto implica tener que partir de tejidos y/u órganos asexuales. Este tipo de fuente de explante suele tener asociados problemas de alta contaminación tanto exógena como endógena.

La eliminación de los microorganismos externos podría parecer una tarea rutinaria pero no siempre es fácil encontrar un balance adecuado entre la descontaminación y la supervivencia del material vegetal, especialmente cuando éste proviene de ejemplares creciendo al aire libre. Existen varias alternativas posibles para reducir el nivel de contaminantes microbianos externos, como (1) cubrir la parte que desea utilizar para evitar, sobre todo, el contacto directo del agua de lluvia, (2) utilizar brotes o chupones de reciente formación y (3) disponer de ejemplares enraizados y/o injertados bajo condiciones controladas en un invernadero. Este último procedimiento ha sido utilizado frecuentemente en diferentes especies de nogal (Driver y Kuniyuki 1984, McGranahan *et al.* 1987, McGranahan y Leslie 1988, Navatel y Bourrain 2001, Bosela y Michler 2008, Sánchez-Olate *et al.* 2009). En muchos casos no basta con el mantenimiento de los rametos en el invernadero sino que también es necesario aplicar tratamientos estimulantes con BAP y/o GA₃ para la emisión de brotes frescos y mejorar la respuesta *in vitro* (McGranahan *et al.* 1987, McGranahan y Leslie 1988). Algunos autores recurren a métodos más tradicionales como la poda sucesiva de las plantas aviveradas (Bosela y Michler 2008), mientras que otros, como Navatel y Bourrain (2001), simplemente injertan el material deseado en patrones en invernadero.

Pero en ocasiones no queda más alternativa que partir de material desarrollado bajo condiciones naturales. Es entonces cuando aparecen todo tipo de inconvenientes, como la formación excesiva de callos, crecimiento lento y la mencionada contaminación de los cultivos (McGranahan *et al.* 1987). Problemas a los que habría que añadir la profusa emisión de exudados al medio de cultivo. A pesar de ser este un gran inconveniente y de estar asociado indisolublemente a los nogales no se ha podido encontrar ninguna investigación en la que se aborde la solución de esta problemática. Únicamente se hace referencia a la realización de subcultivos frecuentes, que en algunos casos podrían ser cada 24 h, especialmente durante las primeras semanas (McGranahan *et al.* 1987, McGranahan y Leslie 1988).

La fase de proliferación no suele tener mayores complicaciones. Existe bastante consenso sobre qué hormonas utilizar e incluso sobre las dosis. Como citoquinina se utiliza mayormente el BAP, mientras que el AIB es la auxina más usada. Driver y

Kuniyuki (1984) probaron varias concentraciones de ambas fitohormonas, llegando a la conclusión de que una combinación óptima de ambas sería 4,5 μM de BAP y 5nM de AIB; esta última concentración, probablemente un error tipográfico, una vez que McGranahan *et al.* (1987) la sitúan en 0,05 μM , o lo que es lo mismo 50 nM. En general, las concentraciones de BAP oscilan entre 4,0 y 4,4 μM mientras que menos variaciones se efectúan sobre el AIB (Driver y Kuniyuki 1984, McGranahan *et al.* 1987, McGranahan y Leslie 1988, Navatel y Bourrain 2001, Bosela y Michler 2008, Sánchez-Olate *et al.* 2009). No obstante a ello, algunos autores han evaluado el uso de otras hormonas intentando mejorar el vigor y el comportamiento de los cultivos, como GA₃ (McGranahan y Leslie 1988) y ZEA y TDZ (Bosela y Michler 2008), sin lograr los objetivos propuestos u obtener alguna ventaja apreciable sobre la sustitución del BAP.

A diferencia de la proliferación, el enraizamiento suele tener toda clase de inconvenientes, traduciéndose generalmente en la incapacidad de los microbrotes para formar raíces. Al igual que la introducción y el establecimiento, el enraizamiento está fuertemente determinado por el genotipo. Jay-Allemand *et al.* (1992), reportan para varios genotipos de nogal híbrido porcentajes de enraizamiento que oscilan entre el 6 y el 100%. Este determinismo genético también ha sido observado en *J. regia* (Navatel y Bourrain 2001, Dolcet-Sanjuan *et al.* 2004, Vahdati *et al.* 2004, Leslie *et al.* 2010) y diferentes híbridos (Leslie *et al.* 2006). Aunque algunos autores han desarrollado métodos para enraizar estacas de nogal (Pijut y Moore 2002, Pijut 2004), éstos son complejos y de limitado alcance en un sistema de propagación comercial.

El enraizamiento *in vitro* en nogal se realiza normalmente en 2 etapas. En la primera, conocida como pre-inducción, los cultivos se incuban en la oscuridad y en presencia de auxinas, generalmente AIB, y suele durar unos pocos días. La segunda, la de expresión radical, se desarrolla bajo condiciones de fotoperíodo, sin hormonas y se puede extender hasta más de 3 semanas. Jay-Allemand *et al.* (1992) subdividen esta última subfase en el desarrollo *in vitro* e *in vivo* de las raíces, aunque debido a la reducida capacidad de los nogales para enraizar, es bastante probable que el resultado final del proceso haya sido determinado en el laboratorio.

Driver y Kuniyuki (1984) estudiaron la influencia del AIB y del ANA sobre el enraizamiento del nogal Paradox utilizando el WPM, determinando que a pesar de que los microbrotes son capaces de formar raíces en presencia de ANA, murieron durante la aclimatación. Dolcet-Sanjuan *et al.* (2004) confirmaron parcialmente estos resultados al concluir que el AIB y ANA eran más adecuados para la rizogénesis de varios genotipos de nogal que el AIA. Pero el uso del AIB está bastante generalizado para la pre-inducción radical de los nogales, en dosis que oscilan entre los 15 y los 50 μM .

Condición importante para el desarrollo de la pre-inducción es la incubación en condiciones de oscuridad. Aunque Driver y Kuniyuki (1984) y McGranahan *et al.* (1987) utilizan iluminación en esta fase; el uso de oscuridad está bastante generalizado desde los inicios de la década del 90 del siglo XX (Gruselle y Boxus 1990, Ripetti *et al.* 1994). Por su parte, la segunda etapa o de expresión radical se efectúa en condiciones diferentes a las de la pre-inducción. En ésta, además de no incluirse hormonas y de conducirse bajo fotoperíodo, Jay-Allemand *et al.* (1992) introdujeron una modificación importante que mejoraba considerablemente la rizogénesis y la supervivencia, consistente en la inclusión de vermiculita en el medio de cultivo.

La realización del enraizamiento *in vitro* en dos fases, constituye un serio inconveniente para la producción masiva de plantas pero la ineficacia de otras alternativas dificultan su generalización. Por ejemplo, Driver y Kuniyuki (1984) y McGranahan *et al.* (1987) aplican un tratamiento agudo de AIB a microbrotes en la 4^{ta} semana del subcultivo y posteriormente éstos son trasplantados a macetas colocadas en condiciones controladas de invernadero. Por su parte, Revilla *et al.* (1989), sumergen la base de los microbrotes en un medio líquido con auxinas durante 24 h pero la expresión se realiza en condiciones asépticas en un medio de cultivo agarificado. Enraizar directamente en invernadero no solo mejoraría la logística de la producción masiva, sino que también reduciría la mortalidad y aumentaría la calidad de las vitroplantas (Leslie *et al.* 2006). Este ha sido un gran anhelo y un tema recurrente en la micropropagación de los nogales y a pesar de que numerosos esfuerzos han sido realizados sus resultados aún son controvertidos y de escaso aprovechamiento práctico (Leslie *et al.* 2006, McGranahan *et al.* 2006). Debido a la manifiesta recalcitrancia del nogal para la rizogénesis, algunos autores han propuesto incluso el uso de *Agrobacterium rhizogenes* como una metodología alternativa (Caboni *et al.* 2004, Sánchez-Olate *et al.* 2009).

La supervivencia sigue un patrón de comportamiento también guiado por el genotipo. McGranahan *et al.* (2006), incrementaron la supervivencia de patrones de nogal Paradox, del 50 a alrededor del 80% realizando el enraizamiento en condiciones *ex vitro* en vez de como se hacía tradicionalmente, *in vitro*. A pesar de ello, reconocen que a la larga las diferencias entre ambos métodos de enraizamiento son despreciables.

La supervivencia claramente depende de la capacidad de enraizamiento de los brotes. Sin embargo no ha sido posible demostrar una relación directa entre ambos procesos, o al menos no se encontrado ninguna referencia explícita acerca de que los genotipos que mejor enraízan son los que menos mortalidad padecen. Al igual que el enraizamiento, la mortalidad durante el endurecimiento es muy variable y está asociada con el genotipo. Leslie *et al.* (2006), por ejemplo, reportan supervivencias del nogal

Paradox de entre 90 y 22%, promediando un 65%. Por su parte, McGranahan *et al.* (2006) comparan la mortalidad de plantas enraizadas *in vitro* y *ex vitro* en 40 genotipos también de nogal Paradox, encontrando valores que oscilan entre el 0 y el 100%; sin embargo los mejores resultados con un método no coinciden con el otro y viceversa.

Con estos comportamientos tan erráticos y diversos no es difícil comprender que la producción comercial de nogal esté restringida a unos pocos laboratorios a nivel internacional, especializados en pocos genotipos, principalmente destinados a su uso como patrones de injerto. Hecho relevante es que Vahdati *et al.* (2004), citando a López (2001), reconocen que hasta principios del siglo XXI sólo una compañía española había implementado la producción de nogal a escala comercial; dato que fue confirmado posteriormente por Britton *et al.* (2007). En el citado reporte, López (2001) señala que la compañía Vitrotech Biotecnología Vegetal, S.L. (España) había producido por micropropagación más de 200 000 plantas auto-enraizadas de nogal de varias especies y variedades en solo tres años. Según este mismo autor, el 10% de ellas fueron establecidas en condiciones de campo durante 1997 y 1998, demostrando un excelente vigor.

Tabla 2 Listado internacional de las compañías que disponen de protocolos comerciales de nogal por micropropagación*

Compañía/Institución	Ubicación	Contacto	Variedades	Precio
Walnut Improvement Program, UC Davis	California, EUA	http://walnutresearch.ucdavis.edu	>40	
North American Plants	Oregon, EUA	http://www.naplants.com/default.asp	VX211, RX1, Vlach	>1000 plantas 3.00 a 3.60 USD
Meristec	Murcia, España	http://www.meristec.es/	Vlach, IRTA R6, NG23xRA, RGA	¿?
Duarte Nursery	California, EUA	http://www.duartenursery.com/ag-products/walnuts/	Vlach and VX211	¿?
Golden Rootstock Nursery	California, EUA	http://www.goldenrootsnursery.com/order-plants.html	VX211, Vlach, RX1	6.50 a 10.00 USD
MicroParadox	California, EUA	http://www.microparadox.com/index.html	Vlach, VX211, RX1	2.65 a 6.75 USD
Vitroplant Italia srl Società Agricola	Cesena, Italia	http://www.vitroplant.it/index.php?lang=en	Chandler, Franquette	¿?

*búsqueda en internet, actualizada hasta Noviembre del 2015

En la **Tabla 2** aparece un resumen de una revisión del estado actual de la micropropagación masiva del nogal. Según la misma, sólo 7 laboratorios en el mundo tienen capacidad para propagar nogal comercialmente de unos pocos genotipos, básicamente del híbrido Paradox, seleccionados fundamentalmente por su resistencia a patógenos del suelo. De ellos sólo 1, el del campus de Davis, tiene la posibilidad de micropropagar decenas de rametos diferentes con fines investigativos. Algunos de estos laboratorios son ramificaciones del programa de Davis, como MicroParadox. Es de destacar que en esta lista aparece una empresa española Meristec, que según describe en su sitio web produce también nogal para madera.

1.8 Marcadores moleculares

El uso de marcadores fenotípicos está indisolublemente ligado a la creación de nuevas variedades y por consiguiente al desarrollo de la agricultura. Estos no son más que caracteres fácilmente identificables y reconocibles que de forma consciente o no han servido para caracterizar un individuo, asignándoles valores inherentes a él. Los marcadores fenotípicos han sido de gran utilidad también en la realización de estudios de los flujos naturales y artificiales de los organismos así como en la determinación de la estructura genética de las poblaciones. Sin embargo su potencialidad está limitada por las modificaciones que ejerce el ambiente sobre la manifestación de los caracteres. La mayor o menor contribución del ambiente sobre la modulación del fenotipo depende de la cantidad y del peso relativo de cada uno de genes involucrados en su expresión.

Disponer de marcadores genéticos elimina en gran medida el sesgo introducido por el ambiente. En la actualidad se dispone de varias técnicas que permite la utilización de marcadores de ADN. No obstante, muchas de ellas son muy complejas o de baja reproducibilidad, lo que dificulta su ejecución así como contrastar los resultados entre diferentes equipos de investigación.

Al respecto, Jones *et al.* (1997) realizaron un estudio donde compararon los resultados de 3 técnicas usadas rutinariamente como marcadores genéticos en 9 laboratorios europeos, llegando a la conclusión de que los perfiles de RAPDs obtenidos fueron irreproducibles; mientras que los patrones de AFLPs y los alelos de microsatélites fueron comparables entre diferentes laboratorios, a pesar de que en algunos casos con los AFLPs se presentaron algunos problemas iniciales con la ejecución de la técnica. Los resultados en varias especies, como maíz (Smith *et al.* 1997), olivo (Balaj *et al.* 2003), tomate (Rajput *et al.* 2006) y nogal (Doğan *et al.* 2014), entre otras, apoyan también la conveniencia del uso de marcadores SSRs.

Los microsatélites son secuencias muy cortas de ADN redundantes que se encuentran distribuidas en el genoma de todos los organismos vivos, que se repiten en tándem un número variable de veces (Glenn y Schable 2005). Entre sus características más interesantes como marcadores genéticos cabe destacar que:

1) Debido a la alta mutabilidad de las regiones microsatélites, en general, estos marcadores presentan un polimorfismo elevado en cuanto a su longitud, fácilmente detectable con métodos e instrumentación apropiada.

2) Presentan una abundancia relativa muy alta y están distribuidos regularmente por el genoma.

3) El grado de especificidad a nivel de *locus* es grande en general y ello se debe a que los microsatélites suelen estar flanqueados por secuencias únicas, lo que facilita el desarrollo de *primers* para su amplificación específica mediante PCR.

4) No es raro que los *primers* desarrollados para una especie pueden ser transferibles a otras, especialmente si no están muy alejadas filogenéticamente.

5) Los microsatélites son marcadores co-dominantes, lo que posibilita diferenciar fácilmente las variantes alélicas de ambos parentales, si las hubiera; mejorando el proceso de identificación y el establecimiento de relaciones de parentesco entre individuos.

6) Poseen una baja complejidad de ejecución y el coste de su utilización es relativamente bajo.

Los marcadores moleculares de tipo microsatélite o SSR han demostrado ser particularmente útiles para el genotipado a escala individual. En la actualidad existen una gran variedad de marcadores SSRs para muchas especies y géneros forestales; sin embargo en el caso de los nogales pocos trabajos han sido publicados hasta la fecha.

Diversos tipos de marcadores moleculares, como aloenzimas (Arulsekhar *et al.* 1985), RFLPs (Fjellstrom y Parfitt 1994, Fjellstrom y Parfitt 1995), RAPDs (Woeste *et al.* 1996), ITS (Ciarmiello *et al.* 2011, Zhao y Woeste 2011) y SNPs (Ciarmiello *et al.* 2011) han sido empleados con varios miembros de la familia *Juglandaceae*; pero el primer set de marcadores SSR fue presentado por Woeste *et al.* (2002). El mismo se construyó a partir de una genoteca con regiones microsatélites enriquecidas en repeticiones GA/CT. Para la elaboración de las bibliotecas se utilizaron 3 árboles de *J. nigra*. Los primeros 30 marcadores se evaluaron en una muestra formada por 9 nogales negros (**Tabla 3**). El resultado fue un polimorfismo variable en cada *locus*, encontrándose entre 2 y 12 alelos, con tamaños que oscilaban entre los 150 y los 242 pb.

Tabla 3 Cronología de la publicación de marcadores del tipo SSR desarrollados y utilizados específicamente en la familia Juglandaceae

Locus			Objetivo	Especie	Autores
WGA02, WGA07, WGA24, WGA32, WGA45, WGA53, WGA60, WGA70, WGA73, WGA79,	WGA04, WGA11, WGA25, WGA33, WGA47, WGA56, WGA65, WGA71, WGA74, WGA80,	WGA06, WGA17, WGA27, WGA42, WGA53, WGA58, WGA69, WGA72, WGA78, WGA82	Cubrir el vacío de la existencia de marcadores genéticos que permitieran conocer la genética del nogal negro. Así mismo se ofrecía una herramienta de gran potencial en el genotipado de la especie y de otros estudios genéticos. Por vez primera se publican marcadores de tipo SSR para las <i>Juglandaceae</i>	<i>J. nigra</i> L.	Woeste <i>et al.</i> (2002)
WGA01, WGA118, WGA276, WGA332,	WGA09, WGA202, WGA321, WGA349,	WGA89, WGA225, WGA331, WGA376	Identificación de marcadores SSRs para la caracterización de las colecciones de germoplasma de la UC-Davis y el USDA	Híbrido Paradox (<i>J. hindsii</i> x <i>regia</i>), <i>J. regia</i>	Dangl <i>et al.</i> (2005)
	WGA005		Determinar y comparar la diversidad genética de las plántulas y genotipos propagados vegetativamente	<i>J. regia</i> y razas de “Sorrento”	Foroni <i>et al.</i> (2005)
AAG01, WGA97	WGA76,	WGA90,	Determinar el flujo génico de los nogales negros en la región central de los EUA	<i>J. nigra</i>	Victory <i>et al.</i> (2006)
	WGA080, WGA275		Estudio de diversidad e identificación de genotipos	<i>J. regia</i>	Foroni <i>et al.</i> (2006)
WGA142, WGA204,	WGA147, WGA221,	WGA148, WGA256	Estudio del flujo genético del nogal negro desde la época post-glacial y determinar cuáles eran las poblaciones y regiones con interés conservacionista en el norte de los EUA	Varias especies e híbridos de nogal	Ross-Davis y Woeste (2008)
	WGA42, WGA70,	WGA79	Examinar el grado de diversidad genética y la diferenciación de los nogales recogidos del centro y el suroeste de China y comprender la relación genética entre <i>J. regia</i> y <i>J. sigillata</i>	<i>J. regia</i> , <i>J. sigillata</i>	Wang <i>et al.</i> (2008)
WJR007, WJR069, WJR115, WJR265,	WJR031, WJR073, WJR142,	WJR061, WJR100, WJR202, WJR279, WJR281	Identificación de variedades locales	<i>J. regia</i>	Chen <i>et al.</i> (2014)
WGA101, WGA110, WGA116, WGA126, WGA133, WGA136, WGA140, WGA153, WGA168, WGA182, WGA193, WGA198,	WGA104, WGA111, WGA123, WGA127, WGA134, WGA137, WGA145, WGA160, WGA169, WGA185, WGA195,	WGA108, WGA112, WGA125, WGA131, WGA135, WGA139, WGA150, WGA167, WGA171, WGA190, WGA196, WGA200	Evaluación de nuevos marcadores de la genoteca enriquecida en repeticiones GA (Woeste <i>et al.</i> 2002)	<i>J. regia</i>	Topcu <i>et al.</i> (2015)

De las 450 muestras positivas encontradas por Woeste *et al.* (2002) en la genoteca de microsatélites, Dangl *et al.* (2005) probaron 147 parejas de *primers*, de las que 12 demostraron ser lo suficientemente polimórficas como para analizar la diversidad

genética de 47 accesiones de nogal Persa y un híbrido Paradox. También en 2005 Foroni *et al.* publicaron el empleo de algunas de las parejas antes mencionadas, junto con una no utilizada anteriormente, con el objetivo principal de determinar y comparar la diversidad genética entre plántulas y genotipos propagados vegetativamente de variedades locales de nogal “Sorrento”. Por su parte, Victory *et al.* (2006) para determinar el flujo génico de los nogales negros en la región central de los EUA utilizaron 12 marcadores, entre los que se encontraban algunos de los microsatélites utilizados por Woeste *et al.* (2002), además de algunos nuevos provenientes de la misma biblioteca. En 2006 Foroni *et al.* introducen dos nuevos marcadores de esta genoteca para diferenciar genotipos de nogal europeo. Posteriormente Ross-Davis y Woeste (2008) incorporan otros 6 inéditos en un estudio genético en el que incluyeron 9 especies y 5 híbridos de nogal diferentes; mientras que Wang *et al.* (2008) reportan la utilización de otros 3 por vez primera. El último trabajo en el que aparecen 35 SSRs no utilizados hasta el momento de la biblioteca genómica de *J. nigra* (Woeste *et al.* 2002) fue realizado por Topcu *et al.* (2015). Así, encontramos otras publicaciones en diferentes países y especies de nogal en los que es recurrente el uso de los antes mencionadas marcadores con los más diversos propósitos (Robichaud *et al.* 2006, Foroni *et al.* 2007, Pollegioni *et al.* 2009, Karimi *et al.* 2010, Ebrahimi *et al.* 2011, Ruiz-Garcia *et al.* 2011, Ahmed *et al.* 2012, Mahmoodi *et al.* 2013, Doğan *et al.* 2014).

Una nueva aproximación al desarrollo de nuevos marcadores de tipo SSRs fue presentada por Wu *et al.* (2012) al confeccionar una genoteca enriquecida en regiones microsatélites a partir de clones de ADN de *J. regia* utilizando BESs. Tomando éste trabajo como referencia, Chen *et al.* (2014) crearon 12 nuevos SSRs (**Tabla 3**) provenientes de la antes mencionada genoteca y los emplearon para la identificación de 35 cultivares chinos de nogal (*J. regia* L.).

2. OBJETIVOS

1. Objetivos

En la presente tesis se persiguieron dos objetivos básicos, los que a su vez se desglosaron en varios específicos:

1. Desarrollar un protocolo de micropropagación funcional para el nogal híbrido maderero
 - 1.1 Diseñar un protocolo para el saneamiento de material *in vitro* contaminado
 - 1.2 Diseñar un protocolo funcional para la introducción y establecimiento *in vitro*
 - 1.3 Optimizar la obtención de microbrotes de calidad durante la fase previa al inicio del enraizamiento
 - 1.4 Determinar las condiciones adecuadas para el enraizamiento
 - 1.5 Reproducir genotipos selectos por micropropagación
2. Desarrollar un protocolo para la caracterización genética del nogal híbrido maderero por medio de marcadores microsatélites (SSR)
 - 2.1 Evaluar el poder discriminante de los marcadores SSR publicados y utilizados en la familia *Juglandaceae*
 - 2.2 Desarrollar marcadores específicos del tipo SSR para el nogal híbrido maderero

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y Métodos

3.1 Material vegetal

Para los ensayos, excepto cuando se aclare lo contrario, fue utilizado un híbrido de nogal maderero, resultado del cruce entre *J. major* (Torrey) Heller var. 209 x *J. regia* L. El material vegetal usado en esta investigación provino de plantaciones de semilla, las que fueron establecidas en diferentes localidades y sometidas a diferentes manejos (**Tabla 4**). Los árboles plus fueron seleccionados de acuerdo a caracteres dasométricos (DAP y altura), morfológicos (forma del tronco y arquitectura) y de calidad de madera (acumulación de duramen). Además de estos caracteres se utilizó también uno completamente discriminativo: árboles afectados por el chancro bacteriano (agentes causales *Brenneria negrifluens* y *B. rubrifaciens*) eran seleccionados negativamente, independientemente de la ponderación que hubieran recibido para el resto de los caracteres.

Tabla 4 Características de las poblaciones de semilla de nogal híbrido maderero

	Unidad de Gestión Forestal		
	Gerona	Cáceres	Navarra
Coordenadas	42° 09' 55" N 02° 56' 37" O	40° 06' 54" N 05° 20' 32" O	42° 10' 10" N 01° 39' 09" O
Altitud (msnm)	450	350	250
Temperatura Media Anual (°C)	14,7	14,1	13,8
Precipitación Total Anual (mm)	857	844	416
Horas de Sol Medias Mensuales	2330	2992	2240
Humedad Relativa (%)	71	60	67
Características del Suelo	Fuertes, desde textura arcillosa a algo más sueltos, con pH entre 8 y 9	Profundos, de textura media franco-arenosa, con intervalos de pH entre 5,00 y 6,50	Llanos, de aluvión, propios de zonas de vega
Tipo de Manejo	Intensivo (fertirrigación)	Intensivo (fertirrigación)	Extensivo
Marco de Plantación (m)	6 x 5	6 x 5	1 x 1
Edad de Muestreo (años)	12	13	11
Población (árboles)	22105	33283	5007

msnm: metros sobre el nivel medio del mar

3.1.1 Evaluación de la variabilidad existente entre plantaciones de semilla y clonales

El análisis cuantitativo de la variabilidad se realizó usando como referencia las mediciones del DAP y la altura en sectores dasométricos tanto de semilla como clonales, considerando todas las localizaciones disponibles. Las evaluaciones se realizaron entre ciclos vegetativos, durante la parada vegetativa invernal.

Cada sector dasométrico estuvo formado por un número variable de árboles, normalmente entre 30 y 100, dependiendo del grado de variación empírica observado en el terreno. Como las plantaciones fueron establecidas en diferentes épocas, se tuvieron en cuenta una serie variable de años y períodos de plantación, normalmente entre los 4 y 14 años para clon y entre 8 y 16 para semilla.

Debido a que no existen poblaciones estadísticamente comparables, más allá del tipo de híbrido utilizado y de la fuente de plantación, se consideró la totalidad de los datos (12 178), distinguiendo únicamente entre semilla y clon.

Las marras no fueron consideradas en los cálculos de la σ y la $\bar{X}$. El coeficiente de variación (CV) base 100 se calculó de acuerdo a la fórmula:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} \cdot 100$$

Para la comparación de los CV entre las poblaciones clonales y de semilla se aplicó una prueba LSD.

Se utilizaron varias formas de agrupamiento para analizar la variabilidad, que serán descritas en el capítulo 4.1.2.

3.2 Micropropagación

En esta sección se profundizó en los elementos básicos que permitieron desarrollar la capacidad de reproducir los ortetos seleccionados. En la medida de lo posible se optó por solucionar los problemas de la manera más sencilla que la especie y las condiciones permitieron. Este principio guio el trabajo, una vez que el objetivo final era disponer de un protocolo pre-comercial de micropropagación para el nogal híbrido maderero.

3.2.1 Medio de cultivo y condiciones de incubación

El medio de cultivo utilizado fue la versión corregida (DKW-C) por (McGranahan *et al.* 1987) de la formulación definida por Driver y Kuniyuki (1984). Una modificación fue introducida en el medio de cultivo, y se refiere a la sustitución de la fuente de hierro original, FeEDTA, por FeEDDHA (237,7 μ M, contenido de $\text{Fe}^{3+} > 5,7\%$), excepto para experimentos muy concretos. Para la elaboración de los medios de cultivo se partió de soluciones *stock* respetando las concentraciones molares de la formulación DKW-C. Tanto la BAP como el AIB se disolvieron en NaOH (0,1 N). Los reactivos fueron suministrados por Duchefa Biochemie (The Netherlands), en caso contrario se realizará la aclaración pertinente.

Durante la proliferación el medio de cultivo se suplementó con BAP (4,4 μ M) y AIB (50 nM). El pH fue ajustado a 5,6 antes de añadir el agar (5,5 g/L de agar industrial 707469,

Pronadisa, España) y, luego de ser gelificados, se esterilizaron inmediatamente durante 20 minutos a una temperatura de 121°C. Los cultivos fueron incubados en una cámara a una temperatura de 24±0,4°C y un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. En la fase luminosa se utilizaron lámparas Philips (Master TL-D 58W/840) para suministrar una PPFD promedio de 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

El enraizamiento se realizó en dos etapas sucesivas según lo recomendado por McGranahan *et al.* (1987), aunque a diferencia de éstos, durante la primera, los cultivos se incubaron en la oscuridad en vez de utilizar una fase luminosa. Para iniciar la fase de pre-inducción radical, se escogieron microbrotes de al menos 2 cm de longitud, sanos y vigorosos, sin síntomas de defoliación ni ningún otro daño aparente. El medio de cultivo durante esta subfase contenía los macronutrientes reducidos al 50%, mientras que se mantuvo el 100% de los micronutrientes y vitaminas, suplementándose con 58 mM de sacarosa y 50 μM de AIB de acuerdo a Vahdati *et al.* (2004) y Dolcet-Sanjuan *et al.* (2004). Después de 5 días en la oscuridad, la formación de la raíz se vio favorecida por la eliminación de la auxina y la sustitución de la sacarosa por fructosa (83,2 mM) y del agar por vermiculita (4:50, p/v; vermiculita tipo 3, tamaño de grano 1-4 mm, Projar, España), como recomendó Jay-Allemand *et al.* (1992), excepto que el medio gelificado fue reemplazado por medio líquido. Esta segunda subfase tuvo una duración de 2-3 semanas, dependiendo del genotipo, y se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que la multiplicación. Los microtallos enraizados fueron entonces trasplantados a macetas (200 cm³) en una mezcla de turba (50/50 mezcla turba rubia/turba negra, Gramoflor, Alemania) y vermiculita (3:1, v/v) y aclimatados durante 8-10 semanas adicionales en un invernadero entre los meses de Marzo y Agosto. Para las primeras 3 semanas, la PPFD se fijó en un máximo de aproximadamente 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y se garantizó una HR mínima del 70,0%. Durante las 5-7 semanas restantes, se incrementó la PPFD hasta los 450 a 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y se redujo a su vez la HR hasta aproximadamente el 50,0% para facilitar el endurecimiento. La aclimatación se realizó dentro de túneles de plástico cerrados, a los que se les iba retirando gradualmente la cubierta a partir de la 4^{ta} semana para completar el endurecimiento. Las temperaturas dentro del invernadero variaron entre 16 a 32°C durante todo el proceso de aclimatación.

Para los cultivos *in vitro* se utilizaron frascos de 580 cm³ de capacidad. Durante la proliferación y la PAE se dispensaron 80 ml de medio de cultivo, inoculándose 8 explantes por bote. Durante la pre-inducción del enraizamiento y la expresión radical se distribuyeron volúmenes de 60 y 100 ml, respectivamente, con 10 microbrotes por bote. Estas condiciones fueron las más usadas en los experimentos, excepto cuando se aclare lo contrario.

3.2.2 Saneamiento de material contaminado

Teniendo en cuenta que la emergencia y re-emergencia de endófitos es más que un hecho casual durante la micropropagación (Leifert y Cassells 2001) se procedió a buscar una alternativa que permitiera recuperar material contaminado, en vista de las dificultades que entraña el establecimiento *in vitro* de nogal.

Con tal fin se partió de un banco de germoplasma *in vitro* de nogal híbrido, compuesto por 6 genotipos, afectado en su totalidad por contaminaciones microbianas. Para el saneamiento se escogió la utilización individual de antibióticos o PPM™ (Plant Cell Technology Inc., EUA). Las soluciones antimicrobianas fueron esterilizadas por filtración a través de una membrana de celulosa (Millipore) con poros de 0,2 µm de diámetro e incorporadas a los medios de cultivo en la cabina de flujo laminar cuando éstos alcanzaban una temperatura de aproximadamente 40°C. Las inoculaciones se realizaron en el término de las primeras 48 h después de preparados los medios de cultivo. Los explantes se colocaron de manera individual en tubos de ensayo (150 x 25 mm Duran), conteniendo 10 ml de medio de cultivo. En los casos que no se observó proliferación de microorganismos en el medio de cultivo se recurrió a la inoculación de segmentos del explante en un medio de crecimiento microbiano (MCM), como única y más segura vía de diagnosticar el control de la contaminación. El MCM estaba compuesto por extracto de carne y de levadura (5 g/L cada uno; Panreac), glucosa (5 g/L), KH₂PO₄ (2 g/L) y agar (7 g/L). A partir de los crecimientos microbianos se aislaron colonias. Posteriormente se realizaron antibiogramas que sirvieran como referencia en los ensayos de desinfección, así como la identificación de los contaminantes microbianos, si era posible (Departamento de Biotecnología de la ETSI Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid). El medio de cultivo fue el utilizado para la multiplicación.

Las sustancias biocidas utilizadas y las concentraciones empleadas se describen a continuación.

1. PPM: 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 y 4,0 ml/L. Excepto para el control sin PPM y para cada una de las dosis, los explantes estuvieron en agitación (140 rpm) durante 24 h en una mezcla de medio de cultivo y PPM; posteriormente fueron subcultivados a sus respectivos equivalentes en medios de cultivo gelificados.
2. Estreptomicina Trisulfato: 0,0; 10,0 y 50,0 µg/ml
3. Gentamicina Disulfato: 0,0; 15,0 y 75,0 µg/ml
4. Carbenicilina Disódica: 0; 50 y 100 µg/ml
5. Cefotaxima Sódica: 150 µg/ml

La duración de cada subcultivo fue de 4 semanas, al término de las cuales se realizaron las evaluaciones pertinentes, siempre que fue posible.

Previo a los tratamientos con Carbenicilina (CRB) y Cefotaxima (CFT), se procedió a determinar si la contaminación era de origen endofítico, o no. Para tal fin se diseñó un experimento, consistente en inocular en un MCM diferentes tipos de segmentos del microbrote: (I) tercio inferior separado del callo, (II) tercio superior, (III) tercio medio tratado con NaOCl (5,0% de cloro activo) durante 30 minutos, para luego ser lavado con agua esterilizada y secado con papel de filtro también esterilizado y ser inoculado por último en un MCM y (IV) se siguió el mismo procedimiento que para el segmento III, pero éstos fueron cortados longitudinalmente antes de ser colocados con la parte interna en contacto con el MCM. Se tuvo especial cuidado en esterilizar el instrumental antes de manipular cualquier muestra individual, evitando así la contaminación cruzada. Las placas inoculadas fueron incubadas durante 5 días a 35°C en una estufa. Al término del período de incubación se estableció una escala visual para asignar los grados de contaminación: (-) no se observa crecimiento microbiano, (+) crecimiento microbiano visible, creando un halo de unos 2 mm alrededor del segmento o del sitio de emergencia, (++) crecimiento microbiano visible, creando un halo de entre 2 y 4 mm alrededor del segmento o del sitio de emergencia y (+++) crecimiento microbiano visible, creando un halo de más de 5 mm alrededor del segmento o del sitio de emergencia.

Se consideró un microbrote saneado aquel que, además de resultar negativo el cultivo en MCM, mostraba un fenotipo vigoroso con hojas sin manchas ni zonas necróticas, con un callo bien formado de color verde claro y sin ningún halo opaco alrededor.

3.2.3 Introducción y establecimiento in vitro. Ensayos en las fases 0 y 1

Como material de partida para las introducciones se utilizaron ramas epicórmicas de árboles adultos creciendo en condiciones de campo. Debido a las grandes incertidumbres y las dificultades asociadas a esta tarea, dos métodos de introducción fueron utilizados: el de verano y el de invierno-primavera.

Independientemente del método seguido, una vez en el laboratorio las ramas fueron lavadas profusamente con agua y detergente para eliminar la mayor cantidad de residuos posibles. Luego de enjuagadas se sometieron a un tratamiento durante 15 minutos con una solución (0,5%) de Previcur (propamocarb clorhidrato de 60,5% p/v, Bayer CropScience).

Para las introducciones de verano, la recogida del material se realizó normalmente en los meses de Junio-Julio. Antes del tratamiento con Previcur, se seccionaron las ramas, dejando segmentos que portaran al menos 1 yema. Se tuvo especial cuidado, siempre

que fue posible, en dejar una porción de rama por debajo de la inserción de la yema lo suficientemente larga como para permitir los continuos cortes de la parte necrosada en cada subcultivo. A continuación se sometieron a un tratamiento con alcohol (70% v/v) durante ≈ 60 segundos; luego de lo cual se mantuvieron en agitación durante 20 minutos en una solución de NaOCl al 1% v/v (previamente se ajustó el pH de la solución a 7,5 aproximadamente) más unas gotas de Tween 20. Al término de este tratamiento los explantes fueron lavados y mantenidos en un bote con agua esterilizada en el flujo laminar hasta el momento de la inoculación.

En las introducciones de invierno-primavera, se utilizó un método similar al descrito por Vieitez *et al.* (1993) para el inicio del cultivo *in vitro* de *Quercus rubra* L., pero con algunas modificaciones. Se escogieron ramas epicórmicas sanas y vigorosas al final del invierno y se transportaron al laboratorio en bolsas de plástico con etiquetas. Luego del tratamiento con Previcur, se eliminó el extremo apical de las ramas (20-25 cm de longitud) siempre cuidando de que poseyeran yemas grandes, más propensas a dar lugar a los brotes más vigorosos, y se introdujeron en un bote con agua esterilizada. Semanalmente se recortaba la parte basal de los segmentos y se cambiaba el agua. Para promover la brotación, las estaquillas se incubaron en cámaras de cultivo bajo termoperíodo (con un gradiente de temperatura que iba desde un mínimo de 17°C hasta alcanzar los 26°C a las 15:00 h, luego de lo cual la temperatura se fue reduciendo hasta llegar nuevamente a los 17°C) y fotoperíodo de 16 h luz / 8 h oscuridad, en el que la PPFD se incrementaba lentamente para llegar a un máximo de $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ entre las 13:00 y las 15:00 h, punto a partir del cual bajaba lentamente hasta la oscuridad total. Cuando los brotes alcanzaban más de 2 cm de longitud (desde la inserción con la rama hasta el extremo apical), se les eliminaban las hojas y se mantenían 20 minutos en agitación en una solución al 1,0% (v/v) de NaOCl (10,0% p/v) más unas gotas de Tween-20, seguido por un profuso lavado con agua esterilizada. Los brotes esterilizados se mantuvieron en un bote con agua en el flujo laminar hasta el momento de la inoculación.

Los explantes, luego del proceso de esterilización, fueron inoculados en un medio de cultivo agarificado de la formulación DKW-C (McGranahan *et al.* 1987), suplementado con BAP (4,0 μM), AIB (50 nM) y PG (0.6 mM). Se dispensaron 10 ml de medio de cultivo en tubos de ensayo (150 mm de altura y 25 mm de diámetro, Duran). Siempre se mantuvo la individualidad de los cultivos, que fueron incubados en una cámara con un fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h de oscuridad.

Para la detección de la presencia de microorganismos se inocularon pequeñas muestras de tejido vegetal (normalmente parte del callo basal) en un MCM.

3.2.4 Multiplicación y pre-acondicionamiento para el enraizamiento (PAE). Ensayos en las fases 2 y 3

Los ensayos durante esta etapa estuvieron destinados a la obtención de cultivos estables, que rindieran microbrotes de calidad enraizables y con posibilidades de soportar el trasplante a condiciones *ex vitro*.

3.2.4.1 Efecto de la densidad de inóculo y la edad del microbrote sobre el crecimiento in vitro y su influencia sobre el enraizamiento

En ambos ensayos se seleccionaron explantes apicales provenientes de 4 genotipos (DA, D49, D53 y D117) en multiplicación activa. El medio de cultivo fue el descrito para esta fase, utilizando FeEDDHA como fuente de hierro y suplementándolo con 0,4 mM de PG. Se dispensaron 80 ml de medio de cultivo en contenedores de cristal de 380 cm³ de capacidad. Durante la fase de multiplicación se evaluó la longitud del microbrote y se determinó el porcentaje de ellos que tenían más de 20 y 25 mm. Para establecer una densidad de inóculo que permitiera un mejor aprovechamiento del espacio del contenedor sin comprometer la calidad del microbrote, fueron inoculados por bote 6, 8 y 10 explantes. La evaluación del crecimiento se realizó al término de la 5^{ta} semana del subcultivo. Mientras que para determinar el momento más adecuado del subcultivo para iniciar la pre-inducción del enraizamiento se escogieron microbrotes sanos y vigorosos de al menos 20 mm de longitud durante la 4, 5 y 6^{ta} semana. En este experimento se inocularon 8 explantes por contenedor. La influencia de la densidad de inóculo y la edad del microbrote sobre el enraizamiento se valoró al término de la 3^{ra} semana de iniciada la subfase de expresión, contándose el número de microbrotes con raíces así como la cantidad de raíces por microbrote. Para la pre-inducción y la expresión radical se inocularon 7 microbrotes por bote.

3.2.4.2 Determinación de la concentración de sacarosa más adecuada durante la pre-inducción radical

Tres concentraciones de sacarosa (58, 117 y 175 mM) fueron probadas en la subfase de pre-inducción. Los efectos de cada una se evaluaron al final de la expresión radical (3 semanas), anotándose el porcentaje de enraizamiento, el número de raíces, la longitud de la raíz más larga y la altura de los microbrotes.

3.2.4.3 Efecto de la introducción del Floroglucinol sobre la multiplicación, el enraizamiento y la supervivencia ex vitro de las vitroplantas producidas

Se probaron diferentes concentraciones de PG en la fase de multiplicación 0; 0,20; 0,40; 0,60 y 0,80 mM y se evaluó su efecto sobre la proliferación, el enraizamiento y la supervivencia durante la aclimatación. Se inocularon 8 explantes apicales por bote,

conteniendo 80 ml de medio de cultivo. Para este ensayo se utilizaron 9 genotipos (DA, DE, DM, DN, D15, D48, D51, D53 y D117). El subcultivo tuvo una duración de 6 semanas, al término de las cuales se midió la longitud del microbrote, se pesaron los callos basales y se contaron la cantidad de nudos por microbrote. La subfase de expresión radical duró 3 semanas, excepto para los clones DA y D15 (2 semanas), al término de las que se anotó el número de microbrotes enraizados, la cantidad de raíces por microbrote y la longitud de la raíz más larga. La fuente de hierro utilizada fue FeEDDHA (273,7 μ M, equivalente a 6,81 mg/L de hierro en forma de Fe^{3+}). En la fase de expresión radical se utilizó glucosa (83,2 mM) como fuente de carbono. La supervivencia se evaluó luego de 6 semanas de iniciada la aclimatación, cuando las vitroplantas se consideraron endurecidas.

3.2.4.4 Efecto de la sustitución del FeEDTA por FeEDDHA como fuente de hierro sobre la multiplicación y el enraizamiento

Dos concentraciones diferentes de FeEDTA (6,81 y 10,21 mg/L de hierro en forma Fe^{2+}) o FeEDDHA (3,40 y 6,81 mg/L de hierro en forma Fe^{3+}), se añadieron al medio DKW-C para comparar los efectos sobre el crecimiento y el enraizamiento. El FeEDTA se preparó a partir de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (33,80 mg/L) y $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50,25 mg/L). Se realizaron soluciones independientes de ambas sustancias. Una vez que estuvieron disueltas perfectamente se calentó ($\approx 45^\circ\text{C}$) la solución que contenía el Na_2EDTA y se añadió lentamente la disolución del FeSO_4 . Luego de alcanzar la temperatura ambiente, se enrazó al volumen deseado, se guardó en una botella ámbar y se almacenó en la nevera, al igual que el resto de los *stocks*. Se inocularon 8 explantes apicales por bote, conteniendo 80 ml de medio de cultivo. Para este ensayo se utilizaron 9 genotipos (DA, DE, DM, DN, D15, D48, D51, D53 y D117). La multiplicación demoró 6 semanas, al término de las cuales se midió la longitud del microbrote y se contaron la cantidad de nudos por microbrote. El medio de cultivo de proliferación se suplementó con 0,4 mM de PG. La subfase de expresión radical se evaluó a las 3 semanas de iniciada, excepto para los clones DA y D15 (2 semanas), anotándose el número de microbrotes enraizados, la cantidad de raíces por microbrote y la longitud de la raíz más larga. En la fase de expresión radical se utilizó glucosa (83,2 mM) como fuente de carbono.

Teniendo en cuenta la existencia de posibles diferencias en el pH del medio de cultivo se realizó un control periódico de éste durante la proliferación antes de ser ajustado, luego del autoclavado, así como a los 3, 6, 10, 20, 30 y 40 días de iniciado el cultivo. Se realizaron 3 mediciones en cada punto por genotipo, tipo de quelato y concentración. Se realizó una repetición y al no observarse diferencias marcadas entre los genotipos se promediaron los resultados.

3.2.5 Ensayos clonales

Un total de 3 ensayos fueron establecidos en 3 localidades diferentes y contrastantes (**Tabla 21**). Para reducir los efectos de la heterogeneidad del suelo, se utilizó un diseño experimental de bloques incompletos al azar latinizados (Williams *et al.* 2002), en los que se procuró que todos los genotipos aparecieran representados al menos una vez dentro de la réplica, excepto para la progenie de semilla del ensayo de La Mota. Cada parcela estaba formada por 4 árboles por clon y su distribución dentro de las réplicas se hizo al azar. En los ensayos de La Mota y El Soto, además de los clones se incluyeron parcelas ocupadas por progenies de semilla del cruce Mj209xRa suministrados por el vivero Arboforest (<http://www.arboforest.com/>), a modo de poder establecer comparaciones más precisas de la evolución de los rametos micropropagados.

3.2.6 Análisis histológicos

Para el análisis del sistema radical, se partió de secciones transversales de la parte basal de microbrotes enraizados. Los cortes se realizaron con un vibratomo (Vibratome 1000 Plus, EUA). Se seleccionaron secciones frescas íntegras, algunas de las cuales se tiñeron directamente en una solución acuosa de azul de toluidina al 0,02% (p/v) durante 2-3 min. Posteriormente se enjuagaron brevemente en agua y se fijaron en portaobjetos para su observación. Por su parte, para observar y comparar la morfología de los estomas, se extrajeron fragmentos de la epidermis (parte abaxial) de árboles adultos, de plantas aclimatadas así como de microbrotes *in vitro* en medio de multiplicación durante la 5^{ta} semana del subcultivo. En todos los casos, las muestras se tomaron entre las venas secundarias y fueron cubiertas con portaobjetos para observación bajo un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axiophot) acoplado a una cámara Leica DFC 300FX.

3.2.7 Diseño y análisis estadísticos

La unidad experimental fue el bote, promediándose los valores de todos los explantes inoculados inicialmente. La cantidad de microbrotes por bote dependía de qué fase se analizaba en el experimento. Las unidades experimentales se distribuyeron al azar en la cámara de cultivo, para cubrir las variaciones de la temperatura e iluminación. Para cada experimento, se realizaron 2 repeticiones independientes como mínimo. El tamaño mínimo de muestra se fijó en 7 botes por tratamiento y réplica. Para evitar el efecto de arrastre, transcurrieron por lo menos dos subcultivos antes de evaluar los diferentes tratamientos, especialmente cuando se analizaban diferentes componentes del medio de cultivo. La longitud del microbrote se midió después de la eliminación del callo basal. Un diseño bifactorial se utilizó para detectar posibles interacciones entre el genotipo y

los diferentes factores analizados. Para determinar la existencia de significación estadística entre los factores de variación, se utilizó un ANOVA. Por su parte, la diferencia entre los tratamientos se determinó por medio de la prueba LSD. Los datos porcentuales se convirtieron a $\arcsen\sqrt{X}$, donde X es el valor del porcentaje dividido por 100.

3.3 Genotipado por medio del uso de marcadores de ADN del tipo SSR

Para genotipar se optó por utilizar marcadores SSR. Sólo se habían descrito, hasta el momento de iniciar esta tarea, algunas parejas de *primers* diseñadas para *J. nigra* (Woeste *et al.* 2002) y han sido utilizadas posteriormente por otros autores también para el nogal negro (Victory *et al.* 2006), *J. regia* (Dangl *et al.* 2005) y *J. cinerea* (Ross-Davis y Woeste 2007). De esta forma se identificaron los *loci* que potencialmente pudieran ser más polimórficos y se evaluó su capacidad discriminante en la población de nogal híbrido maderero.

3.3.1 Material vegetal y extracción del ADN genómico

Se partió de árboles plus de semilla, seleccionados por su diámetro y altura, creciendo en condiciones de campo. Se tomaron muestras foliares, de ramas jóvenes y yemas, teniendo especial cuidado en preservar la integridad individual de cada una. Para reducir la degradación de las muestras y sus contenidos celulares, éstas se conservaron a 6°C en neveras hasta su traslado al laboratorio, para ser almacenadas a -80°C hasta el momento de la extracción del ADN. Antes de proceder a la extracción del ADN genómico, cada muestra se pulverizó con ayuda de N₂ líquido. Para la extracción se utilizó el kit Qiagen DNeasy Plant Mini, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, EUA). La calidad del ADN extraído se comprobó por electroforesis (Agarosa 0,8%, tampón TBE) y la cuantificación se realizó por espectrofotometría ultravioleta (Nanodrop ND-1000, NanoDrop Technologies). Se prepararon alícuotas de trabajo de 5 ng/μl. Tanto los *stock* sin diluir como los de trabajo se conservaron a -20°C hasta el momento de su uso.

3.3.2 Condiciones para la PCR y evaluación de los resultados

Las amplificaciones del ADN se realizaron por medio de la PCR. Para cada reacción se utilizó un volumen final de 10 μl, conteniendo 1 μl de tampón de reacción 10X (1X conteniendo 75 mM Tris-HCl, pH 9,0; 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂ y 20 mM de (NH₄)₂SO₄); 1 μl de ADN genómico (5ng/μl *stock*); 0,8 μl de cada cebador (0,5 μM); 0,2 0,2 μl de una mezcla de dNTPs (200 μM); 0,3 μl de MgCl₂ (2 mM); 0,38 μl de Taq ADN polimerasa (Biotools B & M Labs, España) (0,38 U) y 5,12 μl de agua. Los ciclos de reacción consistieron en una etapa inicial de 5 min a 94°C, seguido por 30 ciclos de 30

seg a 94°C, 30 seg a la temperatura apropiada de hibridación de los cebadores al molde (*annealing*), que fue optimizada para cada pareja, y 30 s a 72°C (polimerización); tras finalizar el último ciclo, se realizó un paso adicional de extensión durante 45 min a 60°C. Para el multiplexado de las reacciones, los cebadores fueron marcados con fluoróforos 6-FAM, PET, VIC y NED (Applied Biosystems, EUA) y los productos de PCR se fraccionaron por electroforesis capilar utilizando un analizador ABI 3730 (Applied Biosystems). Para asegurar resultados consistentes, tres amplificaciones independientes se realizaron por muestra. Los tamaños de los fragmentos se evaluaron con el software Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems). El procesamiento de los datos se hizo por medio del paquete estadístico IDENTITY 1.0 (Wagner y Sefc 1999). Se determinó la probabilidad de identidad aleatoria (PID) y entre hermanos (PID_{Sib}), la heterocigocidad observada (H_{Obs}) y esperada (H_{Esp}), las frecuencias alélicas y la cantidad de alelos por *locus*.

3.3.3 Evaluación del poder discriminante de los microsatélites de la genoteca creada por Woeste et al. (2002) para *J. nigra* en el híbrido maderero

Tabla 5 Detalles informativos de las parejas de primers utilizadas

Locus	Repetición	Secuencia de los primers	Label	Tamaño de los Alelos (pb) ¹	Cantidad de Alelos ¹	Autores
WGA004	(GT) ₅ (GA) ₁₅ , (GA) ₁₁	F: TGT TGC ATT GAC CCA CTT GT R: TAA GCC ACC AGT GTA TGC CA	NED	225-275 ²	2-20 ²	Woeste <i>et al.</i> (2002)
WGA033	(GA) ₁₉ , (GAGT) ₅ , (GA) ₆	F: TGG TCT GCG AAG ACA CTG TC R: GCA TCG TCA TTA CCT GCT CA	NED	202-286 ²	2-9 ²	Woeste <i>et al.</i> (2002)
WGA082	(GA) ₂₃	F: TGCCGACACTCCTCACTTC R: CGTGATGTACGACGGCTG	6-FAM	144-256 ³	46 ³	Woeste <i>et al.</i> (2002)
WGA090	(CT) ₄ T(TC) ₁₄	F: CTTGTAATCGCCCTCTGCTC R: TACCTGCAACCCGTTACACA	6-FAM	132-190	28	Victory <i>et al.</i> (2006)
WGA142	(CT) ₈	F: CAT ATT CCC GGT GAT TTT GG R: TGA CCA CAA ATC GGA GAT GA	⁴	118-228	2-20	Ross-Davis & Woeste (2008)
WGA147	(GA) ₁₄ (GT) ₈	F: TGG AAC TTG TTC TGT GCG AG R: CCG AGT CCC CTT CAC ATC TA	VIC	171-221	3-14	Ross-Davis & Woeste (2008)
WGA148	(AG) ₁₅	F: GGT GAA CTC CCA TAG GGG TA R: CCA ATG CTA CTT GCA GAA CC	NED	230-282	3-15	Ross-Davis & Woeste (2008)
WGA204	(AG) ₁₅	F: GGG TCT CGC CTT CTT TTC TT R: CAC AGA GAG AAG CAC GGG TA	VIC	166-200	2-16	Ross-Davis & Woeste (2008)
WGA221	(CT) ₈	F: CGA CTG CGA AGC CTT TGT AT R: TGG GCA TCA CAC CTA CGT TA	PET	204-247	2-11	Ross-Davis & Woeste (2008)
WGA256	(CT) ₁₉	F: TGA AGA CAA CAA AAC TGC GC R: CCG GCA TTG TTT CTG AAA AT	PET	205-253	4-15	Ross-Davis & Woeste (2008)

pb: pares de bases

¹ Rangos de tamaños alélicos reportados por los respectivos autores

² Tamaños reportados por Ross-Davis & Woeste (2008)

³ Tamaños reportados por Victory *et al.* (2006)

⁴ No marcado con fluoróforo

Se seleccionaron 8 parejas de *primers* de la genoteca WGA (**Tabla 5**). La selección de las parejas se hizo sobre la base del grado de polimorfismo encontrado en las especies probadas. Para este ensayo se seleccionaron 50 árboles plus. Este ensayo perseguía como propósito conocer si estos marcadores eran capaces de amplificar en una muestra del nogal híbrido maderero y, en consecuencia, determinar su capacidad discriminante.

3.3.4 Desarrollo de un set marcadores de tipo SSR específico para el nogal híbrido maderero

Una segunda estrategia para realizar el genotipado, comprendía el desarrollo de un *set* de marcadores desarrollados específicamente para el nogal híbrido maderero. La misma se dividía en tres etapas básicas (1) creación genotecas enriquecidas en regiones microsatélites, (2) diseño de los cebadores y (3) genotipado del material vegetal.

3.3.4.1 Creación de las genotecas enriquecidas en microsatélites

Para llevar a cabo esta tarea se decidió construir genotecas enriquecidas en regiones microsatélites y evaluar sus resultados en el nogal híbrido maderero. Ya se había puesto a punto la extracción de ADN genómico de buena calidad utilizando el kit Qiagen DNeasy Plant Mini. La construcción de genotecas se basó en el protocolo de Glenn y Schable (2005), con las modificaciones que se detallan en los próximos capítulos.

3.3.4.2 Fragmentación de ADN genómico de nogal y ligación de adaptadores S-BamHI

Después de probar varias endonucleasas de restricción, de manera aislada o combinada, se optó por una combinación de *BamHI*, *EcoRI* y *HindIII*. El objetivo era obtener una población de fragmentos con fuerte predominio de tamaños en el intervalo de 100 – 300 pares de bases (pb). Los patrones de tamaño se evaluaron en todos los casos mediante geles de agarosa al 0,8% (p/v) en tampón TBE. La subpoblación de interés se purificó directamente de las mezclas de digestión mediante filtración molecular en mini-columnas QIAquick siguiendo el protocolo del fabricante (Qiagen). Los fragmentos de ADN se suspendieron en agua a una concentración de trabajo de 100 ng/μL.

Se procedió entonces a la unión de adaptadores en los extremos de los fragmentos de ADN. Estos adaptadores proporcionaron un anclaje para subsiguientes reacciones de PCR así como un sitio de restricción *BamHI* para clonaje en pUC19. El diseño se basó en el de Glenn y Schable (2005), con modificaciones. Se sintetizaron los dos oligonucleótidos siguientes (sitio *BamHI* en negrita):

Oligonucleótido S-*Bam*HI directo: 5'- GTTTA**AAGCTT**AGCTAGCAGAATC

Oligonucleótido S-*Bam*HI inverso: 5'- pGATTCTGCTAGCT**AAGCTT**TAAACAAAA

Para preparar el adaptador bicatenario S-*Bam*HI se mezclaron cantidades equimolares de cada oligonucleótido y se añadió NaCl a una concentración final de 100 mM. Esta mezcla se desnaturalizó 5 min a 95°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. En cada reacción de ligación se combinaron los siguientes elementos: 500 ng de ADN fragmentado (en 5 µL); 6,5 µL de solución SNX; 2 µL de ligasa T4 (NEB) y 1,5 µL de tampón de ligación 10X (volumen final: 15 µL). Estas mezclas se incubaron 16-18 h a 16°C. Para evaluar el éxito de cada ligación, se realizaron amplificaciones PCR utilizando como molde alícuotas de 2,5 µL de la mezcla de ligación según describen Glenn y Schable (2005), pero utilizando una temperatura de 48°C (en vez de 60°C) para el paso de hibridación de los cebadores. Este cambio se debe a la sustitución del sitio *Stu*I en el adaptador original (diana AGGCCT) por un sitio *Bam*HI (diana AAGCTT). Las amplificaciones se evaluaron en minigeles de agarosa al 1,0% (p/v) en tampón TBE.

3.3.4.3 Purificación de fragmentos con microsatélites

Este paso es clave para construir genotecas enriquecidas de buena calidad. Considerando los datos disponibles para nogal y otras especies vegetales se decidió utilizar tres oligonucleótidos biotinilados: (GA)₁₅, (CA)₁₅ y (AT)₁₅. A partir de las amplificaciones de PCR del paso anterior, se prepararon mezclas independientes para cada motivo microsatélite: 10 µL de la reacción de PCR (ADN con adaptadores); 10 µL de cebador biotinilado (concentración final 1 µM); 25 µL de solución 12X SSC con SDS al 0,2% (templada, para que se disuelvan los componentes; 1X SSC (15 mM citrato sódico; pH 7,0; 150 mM NaCl); 5 µL de agua destilada (volumen final 50 µL). Estas mezclas se desnaturalizaron 5 min a 95°C en un termociclador y se sometieron a una rampa de temperaturas descendentes como describen Glenn y Schable (2005). El propósito es llevar la mezcla a una temperatura ligeramente superior a la de hibridación de los oligonucleótidos (70°C) y disminuir paulatinamente la temperatura a partir de ese punto, priorizando así la hibridación de los fragmentos de nogal al oligonucleótido exactamente complementario. Cada oligonucleótido se procesó por separado.

Los heterodúplex resultantes se aislaron con partículas de tipo *dynabeads* acopladas a estreptavidina (Dynabeads M280-Streptavidin, Thermofisher), a razón de 50 µL de partículas por cada reacción. Previamente se prepararon las partículas mediante dos lavados con 250 µL de tampón TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) y dos lavados con 250 µL de solución 6X SSC suplementada con 0,1% SDS. Después de cada lavado se sedimentaron las partículas con un imán. Éstas se suspendieron finalmente en 3

volúmenes (150 µL) de solución 6X SSC, 0,1% SDS. Las reacciones de hibridación (50 µL) se centrifugaron entonces 1-2 s y se transfirieron a los tubos con la suspensión de partículas (volumen final 200 µL). Las mezclas resultantes se sometieron a agitación suave (50 rpm) a temperatura ambiente para que los complejos heterodúplex se uniesen a las partículas mediante la interacción específica biotina-estreptavidina. Tras 30 min de incubación, las partículas se sedimentaron con un imán y el sobrenadante se eliminó.

Se procedió entonces a eliminar de las partículas los fragmentos unidos inespecíficamente, utilizando la siguiente secuencia de lavados: (1) dos lavados a temperatura ambiente con 500 µL de SSC 2X, 0,1% SDS; (2) un lavado a 65°C con 500 µL de SSC 1X, 0,1% SDS; y (3) un lavado idéntico al anterior pero a 68°C. Tras eliminar el sobrenadante del último lavado, las partículas se suspendieron en 150 µL de 1 mM Tris, pH 6,8; 0,1 mM EDTA (TE 0,1X) a temperatura ambiente. Los fragmentos que contenían microsatélites se separaron incubando esta suspensión a 95°C durante 5 min. Después de sedimentar las partículas una última vez, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de inmediato, para evitar que volviesen a formarse los heterodúplex oligonucleótido-microsatélite. Los fragmentos purificados se sometieron a precipitación con etanol/acetato sódico a -20°C, se lavaron con etanol y se suspendieron finalmente en 25 µL de agua, manteniéndose en frío hasta su uso.

3.3.4.4 Ligado en el vector pUC19

El ADN enriquecido en cada uno de los microsatélites se amplificó por separado mediante PCR, utilizando el oligonucleótido S-*BamHI* directo como único cebador. Cada mezcla de reacción contenía 2 µL de ADN enriquecido (apartado anterior), 1 µL de ADN polimerasa *Taq* (Biotools), 2,5 µL de tampón 10X, 150 µM de cada dNTP (1.5 µL de una solución 2,5 mM de cada uno), 0.5 µM del oligo S-*BamHI* directo, 2 mM MgCl₂ (2.0 µL de un *stock* 25 mM) y agua hasta completar 25 µL. Programa de amplificación: 1) 3 min a 95°C; 2) 25 ciclos: 20 s a 95°C, 20 s a 48°C, 30 s a 72°C; 3) 5 min a 72°C. La amplificación funciona con un solo oligo S-*BamHI* (el directo en este caso) por la complementariedad entre éste y el inverso:

5'– GTTTAA**AAGCTT**AGCTAGCAGAATC –3' (directo)

3– AAAACAAATTT**CGAAT**CGATCGTCTTAG –5' (inverso)

Las amplificaciones se evaluaron en minigeles de agarosa al 1,0% (p/v) en TBE, utilizando alícuotas apropiadas de las reacciones de amplificación (5 µL). Del volumen restante, 10 µL se sometieron a digestión con *BamHI* (3 h, 37°C). Lo propio se hizo con el plásmido pUC19 (500 ng), siendo el volumen final en ambos casos de 20 µL. Los extremos 5' del plásmido abierto se desfosforilaron 60 min a 37°C con 1 U de fosfatasa

alcalina de timo de ternera (CIP, New England Biolabs) antes de proceder a la ligación del ADN enriquecido. Tras precipitar con acetato/etanol, el vector desfosforilado se resuspendió en 20 µL de agua. Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µl probando tres relaciones vector/ADN purificado (en µL): 2/6, 2/4 y 2/2. Tras añadir 1 µL de ADN ligasa T4 (0,1 U, Invitrogen) y 1 µL de tampón de ligación, las mezclas se incubaron a 16°C durante 16-18 h.

3.3.4.5. Transformación de *E. coli* y preparación de las genotecas

Tras finalizar las reacciones de ligación, se utilizó ½ volumen (5 µL) para transformar células competentes de *E.coli* DH5α. Las células recién transformadas se incubaron a 37°C y 250 rpm en medio SOC. Tras 1 h se añadió ampicilina a razón de 50 µg/mL y se incubó de nuevo a 37°C y 250 rpm hasta que los cultivos alcanzaron una OD₆₀₀ de 0,5 (equivalente a una densidad aproximada de 5 x 10⁸ células/mL). Las células se diluyeron entonces 5000 veces, a una densidad final aproximada de 10⁵ células/mL, y se prepararon *stocks* con glicerol concentrado para almacenamiento a largo plazo de las genotecas (-80°C).

3.3.4.6 Evaluación de la calidad de las genotecas

Para estimar la proporción de bacterias sin inserto se añadieron X-Gal e IPTG a las placas de cultivo (complementación-α), inoculándose con cada genoteca. La presencia de insertos en el sitio *BamHI* de pUC19 desactiva la actividad β-galactosidasa, detectable con el sustrato cromogénico X-Gal. De este modo, la relación entre colonias blancas (con inserto) y azules (sin él) proporciona un indicador del porcentaje de clones positivos en cada genoteca. Las placas para estos experimentos contenían, aparte de X-Gal e IPTG, medio LB, ampicilina a 50 µg/mL y agar al 0,8% (p/v). Una vez inoculadas, las placas se incubaron a 37°C durante 16-18 h, tiempo suficiente para la aparición de colonias y el desarrollo de color.

3.3.4.7 Secuenciación de microsatélites

Para esta tarea se seleccionaron suficientes colonias blancas de cada genoteca. Con cada una de ellas se inocularon 5 mL de medio LB con ampicilina a una concentración final de 50 µg/ml. Estos cultivos se mantuvieron a 37°C y 250 rpm durante unas 16 h y sirvieron de punto de partida para la purificación de vectores recombinantes. Se utilizó el kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Procedimiento: se seleccionaron clones individuales al azar por genoteca, los que se repicaron por duplicado en *arrays* de 96 muestras (microplacas 12 x 8). También se preparó una copia para almacenamiento a largo plazo (*stocks* bacterianos en glicerol concentrado a -80°C). Tras propagar los clones en medio líquido selectivo

(16-18 h a 37°C), se aislaron los plásmidos recombinantes y se determinó la secuencia nucleotídica completa de cada inserto. Se realizaron lecturas individuales de las dos hebras complementarias al menos una vez. En caso de existir discrepancias se repitió el procedimiento. Las lecturas se obtuvieron con los dos cebadores universales de M13, directo e inverso, que flanquean al sitio de clonaje de pUC19.

3.3.4.8 Identificación de los loci

El análisis inicial de los datos globales de secuenciación se centró en tres puntos: (1) eliminar las secuencias de baja calidad o inconsistentes; (2) eliminar las secuencias redundantes; y (3) eliminar las secuencias procedentes del vector pUC19, situadas a ambos lados de cada inserto.

3.3.4.9 Diseño de primers

Una vez que se dispuso de las secuencias de los clones seleccionados, se construyó una base de datos de secuencias potencialmente únicas, identificadas con ayuda del programa AUTO-ASSEMBLER. Para editar las secuencias se utilizó el programa BIOEDIT. Por último, las posibles parejas de *primers* se diseñaron con el programa PRIMER 3.0, definiendo una serie de variables que ayudaran a perfilar sus características (**Tabla 6**).

Tabla 6 Condiciones utilizadas para el diseño de primers con el programa PRIMER 3.0.

Longitud Mínima del Primer	18
Longitud Máxima	22
Tm Mínima del Primer (°C)	53 - 55
Tm Máxima del Primer (°C)	60
Rango Variación Tm (°C)	± 1 - 2
Contenido Mínimo de GC Primer (%)	35
Contenido Máximo de GC Primer (%)	65
Concentración del Primer (µM)	50
Concentración de Sales (mM)	50
Longitud Mínima del Producto	200
Longitud Máxima del Producto	300 - 350

Tm: temperatura teórica de fusión

3.3.4.10 Optimización de los parámetros para las amplificaciones, selección definitiva de las parejas de primers y genotipado del material seleccionado

La extracción del ADN genómico, así como la realización de las amplificaciones y evaluación de los resultados se realizó según lo indicado en los capítulos 3.3.1 y 3.3.2. Para cada pareja de *primers* se determinaron las condiciones óptimas de PCR, con particular énfasis en la temperatura de *annealing*. Los resultados de las amplificaciones

se evaluaron inicialmente mediante electroforesis en geles de agarosa MetaPhor (3,0% en tampón TBE 1X) de alta resolución. Una vez ajustadas las condiciones para cada pareja de *primers* y seleccionadas las que se utilizarían, se procedió al genotipado de los árboles seleccionados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Resultados

4.1 Selección y micropropagación de ortetos fenotípicamente superiores

La producción de madera por métodos científicos e intensivos debe partir necesariamente de poder disponer de árboles con dotaciones genéticas y características fenotípicas superiores. Un segundo paso imprescindible en este proceso productivo es poder tener la capacidad de reproducir esos genotipos selectos, lo que ofrecerá la oportunidad de la realización de estudios para profundizar en su conocimiento y, en definitiva, ser objeto de comercialización.

Abordar ambos temas con idéntica profundidad resulta en extremo excesivo para los objetivos perseguidos. Aunque inicialmente se presentará un breve análisis del programa de mejora para el nogal híbrido maderero, éste tendrá como propósito fundamental describir las condiciones y criterios utilizados bajo las cuales fueron seleccionados los ortetos base del estudio.

Siendo así, se dedicará más atención a la micropropagación de esas selecciones. Partiendo de la base de que el programa de mejora y la reproducción son procesos complementarios e inseparables, con absolutamente la misma ponderación dentro del conjunto, era necesario resolver la gran incógnita de la clonación.

La mayoría de las especies del género *Juglans* son reconocidas como altamente recalcitrantes a casi cualquier técnica de propagación vegetativa. A pesar de que existen algunas técnicas tradicionales usadas con un éxito limitado, éstas no resuelven el problema de la producción masiva de plantas.

Durante la segunda mitad del siglo XX las técnicas de cultivo de tejido pasaron de ser una herramienta investigativa a convertirse en un instrumento productivo y se transformaron en una más que deseable alternativa a la propagación tradicional. Aunque la producción comercial de clones de nogal por cultivo de tejidos se ha convertido en una realidad en los últimos 10 años, ésta aún está restringida a unos pocos genotipos y laboratorios a nivel internacional. Razón por la que era necesario desarrollar un protocolo de micropropagación funcional específico para el nogal híbrido maderero, adaptando y optimizando los resultados científicos acumulados en las últimas 4 décadas.

4.1.1 Programa de mejora por selección para el nogal híbrido maderero

El programa de mejoramiento por selección aquí presentado está basado en un sistema de evaluación y ponderación de diferentes características, que van desde variables dasométricas (diámetro y altura), morfológicas (forma del tronco y diámetro e inserción

de las ramas) y fenológicas (inicio del desborre y longitud del período vegetativo), hasta la respuesta al manejo (cicatrización de las heridas de poda, emisión de chupones), la calidad de la madera (duraminización, aprovechamiento del tronco y color) y el ataque de plagas y enfermedades. La valoración conjunta de todos los caracteres da como resultado una reserva de árboles plus, con fenotipos superiores respecto a las medias de sus respectivas poblaciones.

Considerando la componente genética de estos caracteres y la variabilidad fenotípica encontrada, todo indica que es posible alcanzar una cierta ganancia aplicando selección sobre las progenies de semilla. A pesar del alto grado de parentesco de las poblaciones objeto de estudio, lo cierto es que a través de las evaluaciones y observaciones realizadas a lo largo de más de 15 años se ha podido comprobado que existen grandes diferencias individuales (**Fig.3**), lo que ha permitido realizar selección fenotípica y crear una reserva de árboles con características superiores para la producción de madera.

Como se ha mencionado con anterioridad, la selección de los árboles plus se practicó a partir de plantaciones de semillas, ubicadas en diferentes localidades de la península Ibérica (**Tabla 4**). El comportamiento de éstas estuvo determinada en cierta medida por la aplicación de distintos sistemas de manejo. Mientras que las plantaciones de Cáceres y Gerona recibían un manejo intensivo, con densidades de plantación de 333 árboles/ha; en la de Navarra la densidad fue de algo más del triple (1000 árboles/ha) y su tratamiento fue más tradicional, desde el punto de vista forestal, sin fertirrigación y con la menor cantidad de intervenciones posibles.

El diámetro y la altura, sin duda alguna, caracterizan y valorizan el proceso de selección para la producción de madera. Estos dos caracteres alcanzan por tanto una ponderación bastante alta dentro del esquema de selección que aquí se presenta. Strauss *et al.* (1992), expresan que en especies forestales podría ser beneficioso aplicar selección sobre caracteres valiosos, de baja heredabilidad como el diámetro y la altura; sin embargo, reconocen que estas características, a menudo muestran interacción genotipo ambiente y correlacionan con otros caracteres indeseables, controlados por genes menores, lo que sin dudas resta efectividad a este tipo de marcadores. A pesar de ello, son caracteres que reflejan perfectamente el progreso de los individuos y las plantaciones y además son relativamente fáciles de medir.

Para considerar un árbol con características sobresalientes se compararon sus valores con los de la media del sector en el que se encontraban; de esta forma se eliminó en cierto grado el factor modulador del ambiente. Woeste (2002) utiliza el mismo procedimiento en la evaluación de una población de nogales negros de semilla,

seleccionando lo mejores árboles por medio de una comparación con las medias poblacionales para cada carácter. Analizando el DAP y la altura, se puede comprobar que especialmente significativos fueron los crecimientos diametrales de los genotipos D101, D108, D117 y D118, de Gerona, así como el D214 y el D215, de Navarra (**Tabla 7**). A pesar de ello, en un sistema de selección ponderativo el D101, el árbol con mayor DAP registrado hasta el momento, tendría un menor valor global que el genotipo D107, por ejemplo, también localizado en Gerona, que posee una mejor forma y un mayor tramo aprovechable del tronco, lo que sin duda incrementaría el aprovechamiento industrial y, en definitiva, el rendimiento de la plantación.

Tabla 7 Características de las selecciones de árboles plus en 3 localidades diferentes

Ubicación	G	DAP (cm)	DAPS (cm)	IRS (%)	A (m)	AMS (m)	IRS (%)	F	TL (m)	GRM	In vitro
Cáceres I	DA	25,3	18,7 ± 2,5	35,3	14,0	11,7 ± 1,3	19,7	4	5	1	Si
Cáceres I	DC	24,5	18,7 ± 2,5	31,0	16,5	11,7 ± 1,3	41,0	7	5	3	No
Cáceres I	DE	24,4	18,7 ± 2,5	30,5	18,1	11,7 ± 1,3	54,7	6	5	2	Sí
Cáceres I	DN	26,0	18,7 ± 2,5	39,0	15,8	11,7 ± 1,3	35,0	7	5	1	Sí
Cáceres I	DM	22,6	18,7 ± 2,5	20,9	15,2	11,7 ± 1,3	29,9	7	4	1	Sí
Cáceres I	D20	24,9	18,7 ± 2,5	33,2	16,2	11,7 ± 1,3	38,5	4	5	3	No
Media del Sector		24,6	18,7 ± 2,5	31,5	15,9	11,7 ± 1,3	36,0				
Cáceres II	D50	26,2	19,4 ± 3,6	35,1	20,0	17,4 ± 2,8	14,9	6	6	3	No
Cáceres II	D51	27,2	19,4 ± 3,6	40,2	20,4	17,4 ± 2,8	17,2	4	7	2	Sí
Cáceres II	D53	24,4	19,4 ± 3,6	25,8	18,1	17,4 ± 2,8	4,0	4	5	1	Sí
Cáceres II	D56	21,6	19,4 ± 3,6	11,3	17,9	17,4 ± 2,8	2,9	7	5	DS	No
Cáceres II	D63	25,2	19,4 ± 3,6	29,9	20,3	17,4 ± 2,8	16,7	7	6	2	Sí
Media del Sector		24,8	19,4 ± 3,6	28,1	19,3	17,4 ± 2,8	11,0				
Gerona	D101	32,3	18,5 ± 3,1	74,6	15,7	12,3 ± 1,4	27,6	4	5	3	No
Gerona	D102	24,6	18,5 ± 3,1	33,0	18,2	12,3 ± 1,4	48,0	7	5	DS	No
Gerona	D103	26,0	18,5 ± 3,1	40,5	15,2	12,3 ± 1,4	23,6	5	5	DS	No
Gerona	D104	25,5	18,5 ± 3,1	37,8	14,3	12,3 ± 1,4	16,3	7	4	3	No
Gerona	D106	25,2	18,5 ± 3,1	36,2	17,9	12,3 ± 1,4	45,5	7	5	3	No
Gerona	D107	26,6	18,5 ± 3,1	43,8	15,8	12,3 ± 1,4	28,5	7	7	3	No
Gerona	D108	27,8	18,5 ± 3,1	50,3	17,8	12,3 ± 1,4	44,7	6	5	3	No
Gerona	D109	25,7	18,5 ± 3,1	38,9	13,9	12,3 ± 1,4	13,0	6	4	DS	No
Gerona	D110	26,4	18,5 ± 3,1	42,7	14,2	12,3 ± 1,4	15,4	4	5	DS	No
Gerona	D116	26,5	18,5 ± 3,1	43,2	15,6	12,3 ± 1,4	26,8	6	5	DS	No
Gerona	D117	29,5	18,5 ± 3,1	59,5	17,3	12,3 ± 1,4	40,7	7	5	1	Sí
Gerona	D118	28,2	18,5 ± 3,1	52,4	17,0	12,3 ± 1,4	38,2	7	6	DS	No
Gerona	D128	26,8	18,5 ± 3,1	44,9	15,5	12,3 ± 1,4	34,1	6	6	DS	No
Media del Sector		27	18,5 ± 3,1	46,2	16,2	12,3 ± 1,4	31,6				

Tabla 7 Comportamiento de las selecciones de árboles plus en 3 localidades diferentes (Continuación)

Ubicación	G	DAP (cm)	DAPS (cm)	IRS (%)	A (m)	AMS (m)	IRS (%)	F	TL (m)	GRM	<i>In vitro</i>
Navarra	D201	15,8	12,6 ± 2,2	25,4	13,8	12,6 ± 1,3	9,5	5	5	DS	No
Navarra	D202	14,6	12,6 ± 2,2	15,9	13,7	12,6 ± 1,3	8,7	4	5	DS	No
Navarra	D203	17,0	12,6 ± 2,2	34,9	13,5	12,6 ± 1,3	7,1	4	5	2	No
Navarra	D204	16,7	12,6 ± 2,2	32,5	13,7	12,6 ± 1,3	8,7	4	4	DS	No
Navarra	D205	16,9	12,6 ± 2,2	34,1	13,9	12,6 ± 1,3	10,3	6	5	DS	No
Navarra	D206	14,8	12,6 ± 2,2	17,4	15,3	12,6 ± 1,3	21,4	4	7	DS	No
Navarra	D208	14,6	12,6 ± 2,2	15,9	13,6	12,6 ± 1,3	7,9	4	5	DS	No
Navarra	D209	16,4	12,6 ± 2,2	30,2	13,2	12,6 ± 1,3	4,8	5	6	DS	No
Navarra	D210	15,6	12,6 ± 2,2	23,8	13,2	12,6 ± 1,3	4,8	6	8	DS	No
Navarra	D211	15,2	12,6 ± 2,2	20,6	13,4	12,6 ± 1,3	6,3	6	5	DS	No
Navarra	D212	15,9	12,6 ± 2,2	26,2	13,7	12,6 ± 1,3	8,7	6	4	2	No
Navarra	D213	15,0	12,6 ± 2,2	19,1	13,0	12,6 ± 1,3	3,2	5	7	0	Sí
Navarra	D214	18,9	12,6 ± 2,2	50,0	16,5	12,6 ± 1,3	31	7	6	0	Sí
Navarra	D215	20,2	12,6 ± 2,2	60,3	13,5	12,6 ± 1,3	7,1	6	7	2	No
Media del Sector		16,2	12,6 ± 2,2	28,5	13,8	12,6 ± 1,3	9,8				

G, genotipo. DAP, diámetro a la altura del pecho. IRS, incremento respecto al sector. A, altura. AMS, altura media del sector. F, forma. TL, tronco limpio. GRM, grado de recalcitrancia a la micropropagación.

GRM: 0: No es recalcitrante. Se puede establecer *in vitro* con relativa facilidad

1: Medianamente recalcitrante. Normalmente necesita varios intentos de introducción (3 ó 4), Habitualmente demoran en rendir cultivos viables entre 6 a 10 meses

2: Recalcitrante. Normalmente necesita varios intentos de introducción (5 a 8), Habitualmente demoran en rendir cultivos viables más de 12 meses

3: Altamente recalcitrante. No se ha podido establecer *in vitro* luego de numerosos intentos (>10). Cultivos poco vigorosos, algunos son mantenidos durante varios meses pero terminan colapsando

Respecto a la altura, Bey *et al.* (1974) señalan que éste es probablemente el mejor criterio para evaluar el crecimiento de las poblaciones, sobre todo en edades tempranas, pues aquellos árboles afectados por las heladas tendrán necesariamente una menor altura. Utilizar el híbrido maderero Mj209xRa constituye una garantía en las zonas de plantación elegidas pues ha demostrado cierta tolerancia a las heladas tanto de otoño como de primavera (Guàrdia *et al.* 2013). En los sitios donde el nogal híbrido maderero ha sido establecido, la congelación de las yemas no ha constituido un problema objeto de preocupación, a pesar que en algunas de las localidades, como Cáceres, las heladas en primavera suelen ser frecuentes (<http://www.aemet.es/es/serviciosclimaticos/datosclimatologicos>). Quizás la característica que más distingue al híbrido es que suele ser de brotación media-tardía (Aletà *et al.* 2008); existiendo casos extremos, como el clon D15, que en años de temperaturas mínimas muy bajas puede comenzar el desborre en el mes de Junio, lo que probablemente ha contribuido a evitar los daños por bajas temperaturas. Aunque la altura es menos variable que el DAP, y por tanto ofrece menos posibilidades de selección, se puede comprobar que todos los árboles plus poseen alturas superiores a

la media, siendo especialmente impactante la del árbol DE (Cáceres I) que supera a la media del sector en casi 6 m.

Al analizar el conjunto se observa claramente que existen diferencias entre sectores y fincas para el DAP y la altura, quedando así evidenciada la influencia del ambiente sobre el crecimiento de las plantaciones. Las poblaciones ubicadas en Cáceres y Gerona tuvieron mayor crecimiento que la de Navarra, pudiendo ser consecuencia de los estrechos marcos de plantación utilizados en ésta última. Al respecto Rink y Clausen (1989), al comparar 3 ensayos de progenies con diferentes espaciamientos entre árboles, señalan que cuando se utilizaron marcos estrechos los árboles crecieron poco y muy finos.

Por estas razones, es importante realizar un análisis casuístico e individualizado durante el proceso de selección. Por ejemplo, al comparar las poblaciones de Cáceres II y Navarra se puede comprobar que ambas ofrecerían porcentajes de ganancias por selección similares para ambos caracteres (**Tabla 7**). Sin embargo tanto el DAP medio como la altura de la primera son superiores al de la segunda, sugiriendo que quizás se haya aplicado una mayor presión de selección en Cáceres II que en Navarra, cuando en realidad lo que ha sucedido es que las poblacionales tienen comportamientos distintos, pudiendo concluir que se han aplicado criterios de selección proporcionales. A pesar de poseer ambas plantaciones edades semejantes en el momento de la selección, las diferencias observadas podrían tener su origen no sólo en las diversas condiciones edafoclimáticas en las que se han desarrollado sino en los distintos tipos de manejos aplicados a una u otra.

Por otra parte, si para la elección de los mejores individuos de la población de Navarra se utilizara como referencia la media del sector de Cáceres II habría que descartar todos los árboles por altura y solo quedarían por DAP el D214 y el D215. En el caso contrario muchos más árboles serían seleccionados de Cáceres II, una más que clara sobrestimación del verdadero valor de éstos. Aunque la superioridad genética solo podrá ser establecida cuando las variaciones ambientales sean las mismas para todos los genotipos, partir del valor real aproximado de cada árbol elegido ahorrará muchos recursos y esfuerzos inútiles en los ensayos clonales. **Siendo así, se podría señalar que en cada proceso de selección se debería considerar las variaciones locales, tanto naturales como artificiales, y no realizar transposiciones de los valores de una población a otra.**

Aun considerando la existencia de altas h^2 para el DAP y la altura, existen otros factores que determinarán el éxito del programa de mejora y de las futuras plantaciones

comerciales (Woeste y McKenna 2004). En cualquier caso, y como señalaban Michler *et al.* (2007), pocas expectativas existen de lograr algún avance por selección únicamente sobre el diámetro y la altura en las primeras fases tempranas de desarrollo.

La forma del tronco es un carácter que define la utilidad industrial del volumen alcanzado, y por consiguiente el precio de la materia prima en el mercado. Varios autores coinciden en la importancia de este carácter y en la necesidad de contar con poblaciones formadas por árboles con troncos lo suficientemente rectos como para ser considerados de aprovechamiento industrial (Bey y Williams 1974, Beineke 1991, Woeste y McKenna 2004, Vilanova y Aletà 2011).

Este es un carácter muy difícil de valorar pues su evaluación depende de criterios forestales e industriales. En nogal, para la valoración de la forma la mayoría de los autores utilizan sistemas irreproducibles y de aplicación limitada. Pero Beineke (1991), propone una escala de 5 grados, en la que, además de la rectitud del tronco, incluye otras características como la emisión de chupones y la existencia de bifurcaciones (tenedores). Aunque de alguna manera esta escala contribuía a sistematizar el proceso de selección, la valoración que hacía de la forma continuaba siendo muy subjetiva y dificultaba la asignación de los grados.

Fig. 4 Escala de grados propuesta por McDonald *et al.* (2000) para definir la rectitud y aprovechamiento de los troncos

Una escala más operativa y aprovechable es la propuesta por McDonald *et al.* (2000) para picea (*Picea sitchensis*), que a diferencia de la de Beineke (1991), tiene en cuenta los requerimientos de la industria. Por ser mucho más práctica y clara en su

planteamiento, ésta es la que se utilizó en el programa de selección del nogal híbrido maderero. Esta escala se centra en la valoración de la rectitud del tronco en los 6 primeros metros (**Fig. 4**) y está compuesta por 7 grados, en la que el 7 corresponde al máximo grado de aprovechamiento y el 1 se asigna a los árboles no aprovechables por la industria.

Como se observa en la **Tabla 7**, muchos de los árboles seleccionados poseen una forma sinuosa (grado 4), lo que disminuye su valor industrial, sin embargo éstos fueron incluidos dentro del programa de mejoramiento por poseer segmentos aprovechables suficientemente grandes ($\geq 5\text{m}$), lo que equivaldría a asignarles el grado 7 y en muchos casos serían mejores que los de grado 5 de la escala McDonald *et al.* (2000).

Teniendo en cuenta estos resultados y buscando el máximo rendimiento del programa mejora y el mayor aprovechamiento de las futuras plantaciones clonales, se definió como criterio mínimo para seleccionar árboles plus el 4^{to} grado con un tramo aprovechable de al menos 5 m. Si bien es cierto que algunos aspectos del hábito de crecimiento de un árbol podrían ser transmitidos a una descendencia clonal, también un detalle a considerar es que algunos de estos defectos pueden a su vez ser corregidos con un manejo adecuado.

La industria no sólo valora de forma positiva la rectitud y cilindridad del tronco, sino también la ausencia de nudos saltadizos, causados normalmente por heridas de poda (Woeste y McKenna 2004). La capacidad de emisión de chupones y de cicatrización tienen una cierta componente genética, no obstante los efectos adversos que provocan pueden ser minimizados por un manejo más adecuado de las plantaciones. Precisamente por estas razones fue que se valoró con mucha cautela estas características en el proceso de selección, una vez que han estado determinadas principalmente por la época y los criterios de poda aplicados, la calidad de la estación (suelos y niveles de insolación), los marcos de plantación utilizados, entre los factores más influyentes.

La valoración sobre la coloración de la madera suele depender de los requerimientos del mercado y la industria, mientras que la presencia de duramen suele aportar un valor añadido (Woeste 2002). En este caso, éste no ha sido un carácter discriminatorio, aunque sí se tiene caracterizado el grado de duraminización de cada árbol seleccionado, revelándose una gran variabilidad en las evaluaciones realizadas (**Fig. 3**). Los ensayos clonales deberían demostrar la conveniencia o no de incluir el grado de acumulación de duramen como un criterio de selección; algo en absoluto fuera de sentido pues en el caso del nogal negro Woeste (2002) encontró valores de heredabilidad en sentido

estrecho (h^2e) moderados tanto para el área (0,40) como para el porcentaje de duramen acumulado (0,27), constituyendo una oportunidad para obtener cierta ganancia por selección sobre estos caracteres.

El grado de tolerancia a factores bióticos suele ser una de las principales causas de selección negativa en un programa de mejora. Especialmente crítico e importante es en especies de ciclos prolongados, como los árboles. A diferencia de los caracteres antes mencionados, la reacción al ataque de plagas y enfermedades puede evaluarse, en general, en etapas muy tempranas. Aunque aún para el mejoramiento del nogal híbrido maderero no se incluyen pruebas de este tipo, la monitorización constante en las plantaciones, y más concretamente en los pies madres seleccionados, es parte del programa de selección.

Al igual que con las heladas, las pérdidas y daños por factores bióticos no han constituido un problema a gran escala, aunque sí se han registrado algunas afecciones causadas por el chancro bacteriano (*Brenneria negrifluens* y *B. rubrifaciens*). Independientemente del grado de daño presentado (**Fig. 5**), cualquier árbol con potencialidad de convertirse en un plus por su morfología y crecimiento era descartado inmediatamente.

Fig. 5 Diferentes grados de daños provocados por la bacteria *Brenneria* en plantaciones de semilla de híbrido Mj209xRa

Las afecciones causadas por el chancro bacteriano son bastante conspicuas y fáciles de reconocer, caracterizándose por la aparición, normalmente en verano, de exudados oscuros en troncos y ramas. El agente causal de esta enfermedad, se encuentra distribuido por casi todo el mundo (González *et al.* 2002, Ménard *et al.* 2004,

Yousefikopaei *et al.* 2007, McClean *et al.* 2008, Popović *et al.* 2013, Végh *et al.* 2014), afectando, principalmente, a variedades de *J. regia* L. Aunque Frutos (2010) señala que los daños causados por el chancro no suelen ser importantes, los casos más severos pueden llegar a causar la muerte del árbol (Piccirillo 2003). Razón por la que ésta enfermedad se ha convertido en objeto de selección en el programa de mejora del nogal híbrido maderero. También se mantiene la vigilancia sobre otras enfermedades, como la presencia de *Armillaria*.

El programa de mejora aquí presentado se actualiza periódicamente, sobre la base de los resultados parciales que se van alcanzando así como del fortalecimiento del proceso de selección. Como consecuencia de la última evaluación, se posee una reserva actual de germoplasma formada por un total de 100 árboles, los que representan el 0,0017% del total de la población disponible. Esta selección es monitorizada anualmente y en caso de que se detecte algún defecto o característica indeseable puede el árbol continuar o no dentro del programa, dependiendo de la magnitud y tipo de irregularidad presentada.

Un paso hacia adelante en la evolución y madurez del programa de mejoramiento para el híbrido maderero se logró cuando se alcanzó la capacidad de micropropagar algunas de las selecciones. Los resultados más palpables son el establecimiento de 3 ensayos en diferentes localidades a partir del año 2012, lo que permitirá tener un mejor conocimiento sobre el comportamiento de las descendencias clonales de los árboles plus, completándose así el ciclo de selección. En el capítulo **4.1.3.2.9** se ofrecerán más detalles al respecto.

Tener la posibilidad de reproducir los genotipos seleccionados permitirá además establecer protocolos encaminados a determinar la reacción de éstos frente a enfermedades y/o plagas.

4.1.2 Variabilidad en plantaciones de semilla y plantaciones clonales

Ante la gran disyuntiva de decidir qué tipo de material usar para el establecimiento de plantaciones comerciales de nogal para madera, surgen dos alternativas posibles: uso de progenies sexuales o clonales.

La obtención de productos estables y de calidad son requisitos básicos que demanda la industria del procesamiento de madera (Wiedenbeck *et al.* 2004, Alderman *et al.* 2010). Teniendo en cuenta la variabilidad encontrada en los materiales de semilla disponibles, la mejor alternativa posible es sin duda el uso de clones. Pero usar material genéticamente uniforme no solo mejoraría la percepción del producto por parte de la

industria sino que también facilitaría, y mucho, el manejo de las plantaciones (Ripoll *et al.* 2014), redundando en una disminución de los costes de producción.

Ahora bien, cuál sería la medida exacta de la diferencia en la variabilidad y cómo poder analizarla. Valorar la variabilidad tanto en poblaciones de semillas como clonales, podría parecer *a priori* un ejercicio fácil, máxime cuando se posee un amplio conocimiento empírico de ambos tipos de plantaciones. Si se observa la **Fig. 3**, estas diferencias son perfectamente detectables. Aun tratándose de la F1 de un cruce controlado existe una variabilidad latente que se manifiesta en todos los caracteres observables y de importancia económica en las progenies de semilla. ¿Cuál sería el probable origen de estas diferencias si se parte de la existencia de un único progenitor femenino? Además del ambiente, habría que considerar como principal fuente de variación, al menos para algunos de los caracteres, la participación de varios progenitores masculinos en los cruzamientos. En contraposición a lo que sucede en las plantaciones de semilla, una menor heterogeneidad se observa en las clonales. Asumiendo la misma carga genética en éstas últimas, la variabilidad observada podría ser únicamente fruto de los microcambios en las condiciones edafoclimáticas del sitio en que están establecidas, así como de la competencia entre los componentes individuales de la misma, factores éstos que también contribuirían a exacerbar la heterogeneidad en las plantaciones de semilla.

Si bien realizar un análisis cualitativo de la variabilidad es relativamente fácil, cuantificarla es otra cuestión, especialmente cuando estas plantaciones fueron establecidas con un criterio comercial, no académico. Con idéntico principio fueron establecidos numerosos sectores dasométricos que han permitido conocer de manera aproximada la evolución de las plantaciones, utilizándose como una herramienta de gestión y pronóstico.

El escenario ideal habría sido caracterizar la variabilidad de ambos tipos de plantación sobre la base únicamente de sus diferencias genéticas, pero esto solo será posible con el establecimiento y análisis de ensayos clonales (ver capítulo **4.1.3.2.9**). Aun corriendo el riesgo de hacer valoraciones sesgadas, se considerará que las diferencias de comportamiento son suficientemente grandes como para realizar, al menos, una aproximación general a la evaluación la variabilidad tanto en plantaciones clonales como de semilla.

Como se observa en la **Fig. 6** existe una variabilidad intrínseca a las plantaciones independientemente de su origen. Sin embargo cuando se analizan los CV del total de los sectores dasométricos, tanto para el DAP como la altura, aparecen diferencias

estadísticas entre ambos tipos, resultando en general menos variables las plantaciones clonales (C) que las de semilla (S).

Fig. 6 Diferencias (LSD $p \leq 0,05$) en los coeficientes de variación en poblaciones clonales (C) y de semilla (S). CP1 (clon D15) y SP1 se refiere a subpoblaciones plantadas en el mismo año en localidades diferentes

La variabilidad del DAP es un poco mayor que la de la altura en las poblaciones de semilla, lo que coincide con lo planteado en el capítulo anterior, al expresar que ésta ofrece un poco menos de posibilidades de obtener ganancia por selección que el diámetro. Por su parte, en las poblaciones clonales ambos caracteres poseen porcentajes de variación similares, pudiendo ser consecuencia de su probable asociación, como han señalado varios autores (Beineke *et al.* 1991, Woeste 2002, Aletà *et al.* 2004), o simplemente ser consecuencia de la estabilidad provocada por el origen clonal del material de plantación. A pesar de ello, de algún modo, estos valores del coeficiente de variación son un reflejo de la influencia que ejerce el ambiente sobre el diámetro y la altura, sobre todo en especies forestales, que suelen ocupar grandes extensiones de terreno; detalle a tener en cuenta en el programa de mejora.

Cuando se comparan los CV para el DAP y la altura en dos subpoblaciones representativas (**Fig. 6**), una del clon D15 de 10 savias (CP1), en Galicia, y otra de semilla (SP1), en Gerona, con 13, se puede comprobar que se mantiene el mismo patrón de comportamiento: la variabilidad en la última es el doble que en la primera. Sin embargo, cuando se hace la evaluación de los conjuntos poblacionales por años, las divergencias entre ambas son menos evidentes y el modo en que varían es diferente (**Fig. 7**).

Un detenimiento en el análisis, permite comprobar que los coeficientes de variación para las plantaciones clonales son sensiblemente menores que para las de semilla, entre los 8 y los 10 años. Pero, a partir de aquí se produce un aumento considerable en la variabilidad de las primeras tanto para el DAP como para la altura; mientras que en las segundas la evolución de los CV manifiesta una tendencia más horizontal. La causa probable podría ser que, como las poblaciones clonales crecen a un ritmo más uniforme, el inicio de la competencia entre árboles vecinos se produce de manera súbita, en este caso, a partir del 10^{mo} año de cultivo, lo que afectaría la uniformidad del crecimiento, como ya habían apuntado Bey y Williams (1974).

Fig. 7 Variaciones en los coeficientes de variación para el DAP (a y b) y la altura (c y d) en poblaciones dasométricas clonales (a y c) de Cuenca, Galicia, Gerona y Toledo; así como de semilla (b y d) de Cáceres, Gerona y Toledo

Aunque éste mismo factor podría también tener el mismo efecto sobre las plantaciones de semilla, su influencia sería algo menor para idéntico período pues en éstas el origen de la variabilidad parece estar más en las diferencias genéticas preexistentes que en otros factores. Además, al tener los integrantes de la población diferentes curvas de crecimiento, la entrada en competencia se produciría de manera más heterogénea, por subsectores probablemente, y en ningún caso al unísono como en las plantaciones clonales. Como ya se ha señalado antes, este comportamiento queda reflejado en el trazado de las curvas: mientras que la del clon resulta ser más irregular, la curva del CV para las poblaciones de semilla es más estable, con variaciones más discretas.

Igualmente, el comportamiento de las poblaciones individuales representativas siguen un patrón similar a las de los conjuntos (**Fig. 8**): variaciones más altas en las poblaciones de semillas, pero más estables, que en las clonales.

Fig. 8 Variaciones en los coeficientes de variación para el DAP (a y b) y la altura (c y d) en poblaciones dasométricas representativas del clon D15 (a y c) en Galicia y de semilla (b y d) en Gerona

Otro detalle relevante que se ha podido observar es que, independientemente de utilizar un único clon en los análisis, la variabilidad es diferente entre las localidades, claro reflejo de la influencia del ambiente sobre el comportamiento de las plantaciones.

Tres conclusiones básicas se pueden extraer de estos resultados:

1. Las plantaciones clonales del híbrido maderero son menos variables que las de semilla, lo que sin duda repercute sobre la gestión de unas y otras.
2. Las plantaciones clonales no están exentas del fenómeno de la variabilidad.
3. La variabilidad de las plantaciones clonales es menor en los primeros años de establecidas; aumentando considerablemente con el transcurso del tiempo.

Estos resultados recalcan la importancia de no subestimar la influencia de los factores ambientales sobre el comportamiento de las plantaciones. No sólo las condiciones edafoclimáticas son fuente de variabilidad sino también el tipo de manejo aplicado, constituyéndose éste también en un factor modulador del fenotipo. Como consecuencia lógica, se deriva la necesidad de establecer ensayos clonales en condiciones edafoclimáticas lo más contrastantes posible, como la vía más segura hacia el mejor conocimiento del comportamiento de las selecciones.

4.1.3 Micropropagación

Si bien el saneamiento no forma parte del esquema de micropropagación aquí descrito, sí constituye una herramienta valiosa que permitirá afrontar la re-emergencia de microorganismos en cultivos limpios, fenómeno recurrente e incompletamente entendido en el cultivo de tejidos. En el caso del nogal esta es una de las principales causas de la pérdida de material vegetal y de no disponer de protocolos comerciales de propagación *in vitro* para una gran cantidad de genotipos (McGranahan *et al.* 1987)

4.1.3.1 Saneamiento

Una primera e importante tarea, que estuvo destinada a sanear un banco de germoplasma *in vitro* de nogal híbrido contaminado, ofreció la oportunidad de desarrollar un protocolo de saneamiento que podría servir de soporte a la tecnología de micropropagación así como contribuiría a preservar la integridad del mismo.

Esta colección estaba formada por 6 genotipos (D11, D12, D14, D15, D16 y D19), de los que 5 estaban en fase de evaluación en el Registro de Variedades Protegidas. Además de observarse proliferación microbiana en los medios de cultivo, los microbrotes poseían diferentes tipos de afecciones (**Fig. 9**), que iban desde la falta de vigor, pasando por síntomas de deficiencias nutricionales, clorosis, defoliación y necrosis foliar, hasta su muerte en los casos más severos. Resultó en extremo llamativo el hecho de que los callos basales que se forman eran de coloración oscura y de pequeño tamaño (**Fig. 9c**), lo que podría determinar en alguna medida el escaso crecimiento del brote: en capítulos posteriores se analizará la importancia de la formación de un callo grande y saludable para la obtención de microbrotes de calidad. Estas afecciones redundaban en bajas tasas de multiplicación y en la completa incapacidad para enraizar. Similares afectaciones han sido descritas por varios autores y en varias especies. Thomas (2004) encontró que la causa de la declinación de cultivos de melón de agua aparentemente limpios estaba asociada directamente con la presencia de bacterias endofíticas. Igualmente Miyazaki *et al.* (2011) reportaron que la contaminación endofítica, además de causar pérdidas de material vegetal, afecta la eficiencia de la micropropagación de *Macropidia fuliginosa* (Hook.) Druce. A su vez Thomas y Prakash (2004) comprobaron que la capacidad de enraizamiento y el crecimiento de *Vitis vinifera* se vieron reducidas por causa de la contaminación bacteriana. Por su parte Marino *et al.* (2015) observaron la disminución del número de brotes, el peso fresco de los explantes cultivados *in vitro*, así como de la longitud del explante durante el enraizamiento de la variedad 'MRS 2/5' (*Prunus cerasifera* x *P. spinosa*) durante la fase de multiplicación, al inocular los cultivos con dos especies de

bacterias: *Microbacterium oleivorans* y *Bacillus subtilis*. En general, la contaminación microbiana es la causa del mal comportamiento *in vitro* de muchas especies de plantas, así como de la declinación de cultivos aparentemente limpios, de ahí la necesidad de controlarlos.

Fig. 9 Algunos daños causados por la contaminación microbiana durante el cultivo *in vitro* de nogal híbrido. (a) Brote durante la 4^{ta} semana del subcultivo, mostrando escaso crecimiento y raquitismo. En la parte inferior, y asociada directamente al microbrote, se observa claramente la proliferación de microbiana en el medio de cultivo. (b) Clorosis pronunciada y necrosis foliar. (c) Callos provenientes de microbrotes contaminados (izquierda) y no contaminados (derecha) después de la 5^{ta} semana del subcultivo

Todos los ensayos en esta fase estuvieron condicionados por la poca disponibilidad de material vegetal (de dos genotipos, se disponía de apenas 9 (D14) y 17 (D11) microbrotes) y por el bajo vigor general que poseían los cultivos. Siendo así, continuar o desechar un experimento dependía de la obtención de algún resultado, positivo o negativo, a corto plazo, en algunos casos en el término de 7 días.

A partir de los cultivos contaminados se aislaron varios tipos de colonias bacterianas (**Fig. 10**). Se pudo determinar la presencia de representantes de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*. También se aislaron 2 colonias Gram⁺ que no pudieron ser identificadas. Como se observa en la **Fig. 10**, las colonias bacterianas se caracterizaban por segregar mucílago y uno de los tipos era anaeróbico, capaz de crecer dentro del

medio de cultivo (**Fig. 9a**). Los antibiogramas revelaron que los aislados eran sensibles a Estreptomicina (10 µg/ml), Gentamicina (15 µg/ml) y Kanamicina (20 µg/ml). Con estos resultados se procedió a intentar el saneamiento del material vegetal. Asumiendo el origen endofítico de la contaminación y que las condiciones en las que se realizó el antibiograma son muy diferentes a las que se existen en el interior de los tejidos vegetales, se partió de la hipótesis de que se debían utilizar dosis mayores de los antibióticos que las recomendadas anteriormente.

Fig. 10 Cultivos bacterianos obtenidos a partir de aislamientos de diferentes segmentos de microbrotes de nogal híbrido contaminados. (a) Inoculación a partir del agua del último enjuague luego del tratamiento con NaOCl (5%) durante 30 minutos. (b) Colonias obtenidas de un segmento apical del tallo. (c) Colonias obtenidas a partir de un segmento basal del tallo. Con flechas aparecen algunos de los diferentes morfotipos de colonias bacterianas detectadas

Aunque no se incluyó la PPM en estos análisis, los resultados encontrados en la literatura sobre su uso abrían la posibilidad de alcanzar algún resultado positivo con su tratamiento. Igualmente se prescindió de la KAN, habida cuenta de los efectos tóxicos causados en diferentes especies. Siendo así, en esta primera aproximación para el control de la contaminación microbiana, se usaron la PPM, la EST y la GEN.

4.1.3.1.1 Uso de la PPM, la Estreptomicina (EST) y la Gentamicina (GTM)

Los resultados del tratamiento con PPM, EST y GTM se presentan de manera conjunta (**Tabla 8**) pues no se obtuvo ningún resultado positivo con sus usos para ninguna de las concentraciones empleadas; aunque sí se observaron respuestas diferenciales, dependiendo del tipo de biocida y dosis utilizadas.

Tabla 8 Efecto de diferentes sustancias biocidas sobre el control de la contaminación microbiana presente en el cultivo in vitro de microbrotes de nogal híbrido

Gen.	PPM (ml/L)	Exp	Saneados*	Gen.	EST (µg/ml)	Exp	Saneados	Gen.	GTM (µg/ml)	Exp	Saneados
D16	0	10	0	D15	0	12	0	D12	0	9	0
	0,5	7	0		10	12	0		15	8	0
	1	9	0		50	12	0		75	12	6
	1,5	8	0								
	2	8	0								
	3	12	0								
	4	11	0								

*Se refiere a al hecho de no observarse crecimiento microbiano en el medio de cultivo. Leyenda: EST, Estreptomicina; Exp, número de explantes, Gen, genotipo; GTM, Gentamicina; PPM, *Plant Preservative Mixture*

La PPM es un biocida industrial de amplio espectro, utilizado en el cultivo de tejidos. Está formado por dos isotiazolonas, metilcloroisotiazolinona y metilisotiazolinona. Según datos del fabricante, la PPM aunque actúa afectando enzimas claves en el ciclo de Krebs y en la cadena de transporte de electrones, no causa toxicidad a las plantas en las concentraciones recomendadas para el control de contaminantes microbianos en el cultivo *in vitro* (<http://www.plantcelltechnology.com/ppm-product-information/>). Sin embargo varios autores han reportado efectos adversos en petunia (Compton y Koch 2001, Orlikowska *et al.* 2012), en crisantemo (George y Tripepi 2001) y en algunas briófitas (Rowntree 2006), entre otras especies. Esta sustancia puede ser utilizada tanto de forma preventiva como para el control de la contaminación microbiana en dosis que oscilan entre 0,05 y 0,2% (v/v), aunque durante cortos períodos de tiempos (4 a 12 h) pueden llegar hasta el 5%. También ha sido empleada con el mismo propósito en medios de cultivo sin autoclavar (Niedz 1998). A pesar de la bondades que se le atribuyen, no existe unanimidad en cuanto su papel como biocida universal. Su efectividad no sólo depende de las concentraciones utilizadas sino también del origen del material vegetal y de su uso combinado con otros desinfectantes. Al respecto, Jimenez *et al.* (2006) encontraron que la PPM, combinada con otros biocidas, durante la iniciación de *Guadua angustifolia* Kunth, no era efectiva para el control de la contaminación cuando el material vegetal provenía directamente del campo sin embargo era muy efectiva cuando se utilizaba con plantas de invernadero.

Al emplear la PPM para el control de la contaminación en el nogal, no se alcanzó el objetivo propuesto (**Tabla 8**), incluso para dosis muy por encima de las recomendadas. Luego y durante los tratamientos, las colonias continuaban creciendo en el medio de cultivo y los microbrotes no mostraban ninguna mejoría en su desarrollo y crecimiento. Al mismo tiempo tampoco se observó ningún efecto fitotóxico en el material vegetal aún para la mayor concentración. En vistas de estos resultados se decidió pasar a utilizar una estrategia, *a priori*, más efectiva por medio del uso de antibióticos.

Para los primeros tratamientos se tomó como referencia los resultados de los antibiogramas. Conscientes de que la Kanamicina (KNM) solía ser fitotóxica, se optó por utilizar de manera individual la Estreptomicina (EST) y la Gentamicina (GTM).

Al igual que la KNM, la EST y la GTM pertenecen al grupo de los aminoglucósidos. Estos antibióticos tienen efecto bactericida contra la mayoría de las bacterias aeróbicas Gram⁺ y algunos bacilos anaeróbicos. Los aminoglucósidos, en general, ejercen su efecto en un corto período de tiempo contra colonias en crecimiento activo, lo que está asociado con su efecto inhibitorio sobre la síntesis proteica. Estos actúan perturbando la elongación de los péptidos a la altura de la subunidad ribosomal 30S de las bacterias, provocando traducciones imprecisas del ARNm, dando así lugar a proteínas truncadas o con una composición aminoacídica errónea en sitios claves.

Los aminoglucósidos han sido utilizados ampliamente en el cultivo de *in vitro*. Mientras que la KNM se usa principalmente en trabajos de transformación genética, la EST y la GTM se emplean en protocolos de desinfección de material *ex vitro* y para el saneamiento de cultivos contaminados. Respecto a éste último aspecto, existen diversidad de resultados, muchos contradictorios, aunque algunos puntos en común pueden encontrarse. Por ejemplo, Thomas (2004) suplementando los medios de cultivo de multiplicación y enraizamiento con 50 mg/L de GTM, logró mejorar el crecimiento de brotes de melón de agua contaminados, así como el enraizamiento y el porcentaje de salida de plantas a condiciones *ex vitro*; sin observar ningún efecto fitotóxico, aun utilizando hasta 100 mg/L de GTM y EST. Por el contrario, al Thomas y Prakash (2004) cultivar explantes contaminados de *Vitis vinifera* en presencia de 50 mg/L de GTM sí aparecieron efectos adversos, manifestándose como la aparición de necrosis foliar y la reducción del crecimiento. Pereira y Forte (2003) también comprobaron la acción fitotóxica de la EST en el cultivo *in vitro* de la variedad de papa Baronesa al utilizar dosis superiores a los 32 mg/L. Interesante resultado fue reportado por Reed *et al.* (1995) durante el saneamiento de *Mentha spp.*, al encontrar que la EST aplicada hasta 1000 µg/ml durante 10 días fue más efectiva y menos tóxica en muchos casos que la GTM en dosis de 50 µg/ml. Estos resultados ponen de manifiesto que el solo hecho de

seleccionar un antibiótico no garantiza *per se* alcanzar el saneamiento de cultivos *in vitro* contaminados. La consideración de factores como la especie, método de aplicación, duración del tratamiento, concentración, entre otros, suele ser conveniente tenerlos en cuenta para la erradicación de los microorganismos contaminantes.

Fig. 11 Resultados del cultivo in vitro de explantes de nogal contaminados en presencia de *Estreptomicina* (a y b) y *Gentamicina* (c y d)

Al ser incorporadas la EST y la GTM al medio de cultivo se pudo comprobar que tampoco ejercieron ningún control sobre la contaminación, excepto para el tratamiento con 75 µg/ml de GTM (**Tabla 8**), del que se pudieron aislar 6 explantes de 12, en los que no se observó ningún crecimiento bacteriano luego de 14 días de cultivo. Sin embargo éstos terminaron muriendo al ser subcultivados sin la presencia del antibiótico, probablemente a causa de las severas afectaciones que ya padecían. Con las dosis intermedias (10 y 15 µg/ml de EST y GTM, respectivamente) se ejerció un efecto bacteriostático sobre algunos explantes; al mismo tiempo que aparecían algunas anomalías como la proliferación descontrolada de brotes (**Fig. 11a**), algo inusual en la micropropagación del nogal, y una profusa clorosis además de necrosis foliar (**Fig. 11c**). Era frecuente ver, luego de varios días en presencia de los antibióticos, los explantes con hojas cloróticas y manchas necróticas, en especial para los tratamientos con GTM (**Fig. 11c, d**); con hiperhidricidad pronunciada en los casos que se utilizó EST (**Fig. 11a, b**) y poco

desarrollo del callo basal para la dosis más alta de GTM, lo que posiblemente terminó por limitar el crecimiento del brote. Algunos microbrotes, aunque contaminados, pudieron recuperarse pero la mayoría perecieron. Fue imposible repetir el cultivo en presencia de EST y GTM, incluso para las concentraciones con efecto bacteriostático. Revilla *et al.* (1989), aunque lograron recuperar algunos explantes contaminados de nogal con una mezcla de antibióticos compuesta por Cefotaxima, Rifampicina, y Tetraciclina, también reportaron el predominio de un efecto bacteriostático sobre el bactericida luego del tratamiento.

Otros ensayos realizados (datos no mostrados), en los que se combinaron la agitación en medio líquido con antibiótico y posterior inoculación en el mismo medio de cultivo gelificado, tampoco ofrecieron ninguna alternativa de control. En estos experimentos no solo murieron los explantes sino que fue imposible controlar los crecimientos bacterianos.

Al fracasar con el saneamiento utilizando PPM, EST y GTM, se decidió continuar con el uso de otros antibióticos, también utilizados en el cultivo *in vitro* pero con mecanismos de acción y efectos diferentes, lo que permitiría emplear dosis mayores que las anteriores y afrontar con mayores criterios de éxito el control de la contaminación. Pero antes de continuar con los intentos de control de los microorganismos, dos cuestiones debían ser resueltas antes: (1) determinar si efectivamente el origen de la contaminación era endofítica o se trataba de un mero error de manipulación y (2) qué parte del microbrote era más conveniente utilizar en los ensayos de desinfección, si procedía, y, en caso afirmativo, si era posible realizar algún tipo de diferenciación.

Tabla 9 Resultados de la inoculación en MCM de diferentes segmentos de microbrotes de nogal híbrido visiblemente contaminados

Segmento	Segmentos Inoculados	Segmentos con Crecimiento de Microorganismos	Grado
I	7	7	+++
II	7	7	+
III	4	0	-
IV	6	6	++
IV ^(a)		-	-

(a) Inoculación del agua del último enjuague del segmento IV

Como era de esperar los segmentos con mayor grado de contaminación fueron los basales (**Tabla 9**). Por su parte los extremos apicales, aunque contaminados tenían asociadas las colonias microbianas más pequeñas. Detalle importante fue comprobar que el crecimiento más denso de las colonias en los ápices se localizaba en la zona del

corte. Este dato, unido al hecho de que no se observó ningún tipo de proliferación microbiana en aquellos segmentos intactos que habían recibido un fuerte tratamiento de desinfección (tratamiento IV), sugiere que el origen de la contaminación es endofítico. Para reforzar esta suposición, se comprobó que al ser cortados longitudinalmente este mismo tipo de segmento (tratamiento III) y ser inoculados en el MCM, luego de 5 días, aparecían colonias surgiendo de su parte interior. De manera similar, Thomas y Prakash (2004) determinaron que los extremos apicales de brotes de *Vitis vinifera* contaminados poseían la menor incidencia de asociación bacteriana mientras que el 100% de las muestras tomadas de las raíces y del cuello del tallo estaban afectadas. **Siendo así, era obvio que se podía utilizar una parte del microbrote que poseía una menor incidencia de contaminación microbiana: el segmento terminal, lo que ofrecería mayores garantías de éxito en los experimentos de saneamiento.**

4.1.3.1.2 Uso de la Carbenicilina y la Cefotaxima

La Carbenicilina (CRB) y la Cefotaxima (CFT), aunque han sido utilizados básicamente en trabajos de transformación genética con *Agrobacterium*, también se emplean para el control de la contaminación endofítica en cultivos *in vitro*. Ambos pertenecen a la familia de los β -lactámicos. Esta es una larga familia que incluye las penicilinas, cefalosporinas y compuestos relacionados. La CFT es una cefalosporina de 4^{ta} generación y la CRB es una carboxipenicilina del grupo de las penicilinas. La CRB tiene cobertura sobre bacterias Gram⁻ pero escasa acción sobre las Gram⁺. Por su parte la CFT tienen efecto bactericida contra muchos organismos Gram⁺, Gram⁻ y anaerobios. Aunque no se conoce el mecanismo de acción exacto de la CRB, en general, los antibióticos β -lactámicos ejercen su efecto interfiriendo con la reticulación estructural de los peptidoglicanos (mureínas) en las paredes celulares bacterianas (Holten y Onusko 2000). Debido a su acción, las células bacterianas se lisan por la actividad autolítica de enzimas de la pared celular (autolisinas y mureínhidrolasas), a la vez que el ensamblaje de la pared celular se detiene (<http://www.merckmanuals.com/professional/infectious-diseases/bacteria-and-antibacterial-drugs/cephalosporins>). Siendo que los peptidoglicanos no se sintetizan en las plantas, es esperable que tanto la CRB como la CFT no tengan ningún efecto sobre éstas (Bosela 2009), sin embargo los resultados experimentales han demostrado lo contrario. Yu *et al.* (2001) comprobaron que tanto la CRB como la CFT, además de suprimir el crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens*, incrementaron el peso fresco de los callos de papaya así como el número de embriones somáticos, en dosis que oscilaban entre los 250 a 500 mg/L para la CRB y entre 125 y 250 mg/L para la CFT. Por su parte, en dos híbridos de álamo, se comprobó que la CFT (500 mg/L), sola o combinada con CRB, incrementó el tamaño de los callos y mejoró la

regeneración, estimulando una más rápida formación de los botes y en mayor número, a pesar de que causó serios problemas de hiperhidricidad (Bosela 2009). Agarwal *et al.* (2010) también observaron que la CFT mejoró la diferenciación de brotes de *Eucalyptus tereticornis*, mientras que la CRB tuvo un efecto contrario.

Fig. 12 Efecto de la Carbenicilina (a) y la Cefotaxima (b) sobre el control de la contaminación microbiana y el desarrollo de los microbrotes contaminados de dos genotipos de nogal híbrido maderero, D19 (a) y D16 (b). (a) La aparición de un halo opaco asociado directamente al callo aparece señalado con una flecha. Obsérvese el cambio de coloración en los medios de cultivo sin antibióticos. En el momento de tomar la foto los microbrotes se encontraban en la 4^{ta} semana del subcultivo

Desde la década del 50 del siglo XX se conocía del efecto estimulante de algunos antibióticos en el saneamiento de algunas especies vegetales. A pesar de que sus mecanismos de acción eran desconocidos se consideraba que simulaban el modo de actuar de las fitohormonas. En 1992, Holford y Newbury, demostraron que los productos de la descomposición de la CRB son los ácidos fenilacético (PAA), una hormona que se sintetiza de manera natural en las plantas, y fenilamónico (PMA), que por descarboxilación se transforma en PAA. Respecto a la CFT, no existe ninguna evidencia sólida acerca de cómo ejerce su efecto; al menos no parece actuar en el mismo sentido que lo hace la CRB. Un probable mecanismo como inhibidor del etileno fue sugerido por George *et al.* (1993), lo que podría explicar su efecto positivo sobre la diferenciación y la embriogénesis, pero no su acción citoquinínica.

Los explantes cultivados en presencia de CRB mostraron, de forma general, un mayor vigor. Especialmente significativo fue el impacto sobre la formación del callo basal (Tabla 10 y Fig. 12). Con la introducción de 50 µg/ml se observó un incremento de la longitud y del número de nudos de los microbrotes, lo que pudo ser interpretado como un efecto de la acción de la CRB sobre las bacterias, sin embargo al término del subcultivo se observaba aún la aparición de un exudado en la zona cercana al microbrote y alrededor del callo. Al inocular estas partes en un MCM se comprobó que

efectivamente se trataba de colonias similares a las que ya habían sido aisladas. Con el incremento de la concentración a 100 µg/ml se redujo el desarrollo del brote aunque fue apreciable la presencia de un mayor número de yemas axilares brotadas y de un callo más grande. Al igual que con la dosis intermedia, la presencia de las bacterias estuvo presente, como se comprobó posteriormente con la inoculación en el MCM; manifestándose en algunos casos como la aparición de un halo opaco, directamente asociado al callo (**Fig. 12a**).

Tabla 10 Efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de CRB sobre el comportamiento in vitro y el control de la contaminación en microbrotes del genotipo D19

CRB (µg/ml)	Total Microb.	Longitud Microbrote (mm)	Nudos/ Microbrote	Yemas Brotadas/ Microbrote	Microbrotes con Callo (%)	Diámetro del Callo (mm)	Microbrotes Sanos
0	14	11,9 ± 6,8 ^a	7,3 ± 2,8 ^{ab}	1,6 ± 1,1 ^a	78,6 ± 3,4 ^a	8,8 ± 3,9 ^a	0
50	9	15,6 ± 4,6 ^b	8,6 ± 1,7 ^b	2,5 ± 1,4 ^b	100,0 ± 0,0 ^b	10,8 ± 3,1 ^b	0
100	13	11,8 ± 7,5 ^a	6,5 ± 2,2 ^a	3,1 ± 1,3 ^c	100,0 ± 0,0 ^b	12,3 ± 3,3 ^c	0

Los valores representan la media por tratamiento ± la desviación estándar. La significación estadística se expresa con superíndices. Sólo los valores con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$, prueba de LSD). Las mediciones fueron realizadas al término de la 4^{ta} semana del subcultivo. El diámetro del callo se midió por la parte de mayor anchura. Se consideró como yema brotada aquella que había desplegado al menos una hoja

Los experimentos en esta fase estuvieron muy condicionados por el mal estado del banco de germoplasma, por causa de la contaminación, y por el escaso número de microbrotes existentes por genotipo. En un ensayo paralelo al de la CRB, se inocularon 4 brotes apicales en un medio de cultivo suplementado con 150 µg/ml de CFT. Como se observa en la **Fig. 12b**, los síntomas de recuperación de los microbrotes son comparables a los obtenidos con la CRB, pero más llamativo aún fue comprobar la inexistencia de opacidades alrededor del callo. Sin embargo, esto no significó el control total de la contaminación pues al inocular segmentos de los callos en el MCM se observó la presencia de colonias asociadas a él. Era obvio entonces que el control de los microorganismos no sería cuestión de un tratamiento único de los cultivos con el antibiótico sino que precisaría una estrategia a más largo plazo donde se consideraría necesariamente no sólo la limpieza del material sino además evitar efectos tóxicos severos. Thomas (2004) también sugiere un control constante durante un largo período de tiempo (de 2 a 4 ciclos en presencia de antibióticos), así como la inoculación repetida de segmentos de microbrotes de *Vitis vinifera* en medio de indexación de bacterias. Por estas razones se abordó un experimento en el que se valoraría la influencia del tratamiento crónico con CFT sobre el control de la contaminación y el desarrollo de los microbrotes. Aunque Revilla *et al.* (1989) ya habían advertido de la aparición de

toxicidad con dosis por encima de 25 mg/L de CFT, la inoculación del híbrido maderero en presencia de 150 µg/ml de CFT no produjo ningún efecto adverso visible.

Al igual que para el ensayo con CRB, solo se utilizaron los extremos apicales de los microbrotes. Los segmentos basales de todos los explantes fueron inoculados en un MCM para estar seguros de que se encontraban contaminados al inicio del tratamiento. Al final de cada subcultivo se re-inocularon partes del callo en el MCM: la no existencia de crecimiento bacteriano era el único criterio que certificaba que el microbrote estuviese limpio.

Como se esperaba, la CFT tuvo un efecto positivo inmediato sobre las variables evaluadas. Especialmente impactante fue comprobar que la altura del brote fue casi 4 veces mayor durante el segundo subcultivo en relación con el primero (**Tabla 11**). Aunque ésta variable está estrechamente relacionada con el número de nudos, los resultados sugieren que el mayor impacto del tratamiento de la CFT fue sobre la longitud del entrenudo, una vez que la cantidad de nudos ni siquiera se duplicó en relación con el subcultivo anterior. A partir del tercer ciclo se observó un decaimiento general de los microbrotes, mientras que por el contrario el callo incrementaba su tamaño.

Tabla 11 Efecto del tratamiento crónico con Cefotaxima sobre el comportamiento in vitro de microbrotes contaminados del genotipo D16

Subc.	Total Microbr.	Longitud Microbrote (mm)	Nudos/ Microbrote	Yemas Brotadas Microbrote	Diámetro del Callo (mm)	Peso Fresco del Callo (mg)	Microb. Contam.
I	34	4,4 ± 2,5 ^a	5,2 ± 1,2 ^a	2,1 ± 1,1 ^a	20,6 ± 3,8 ^a	17,2 ± 7,2 ^a	8
II	27	17,4 ± 7,4 ^c	9,1 ± 1,5 ^c	2,9 ± 1,2 ^b	23,7 ± 6,3 ^b	24,4 ± 12,2 ^b	5
III	32	9,3 ± 3,1 ^b	6,1 ± 1,1 ^b	2,8 ± 0,9 ^b	22,9 ± 4,2 ^b	23,4 ± 7,9 ^b	0
IV	26	8,7 ± 1,6 ^b	6,4 ± 0,6 ^b	2,5 ± 0,8 ^{ab}	24,6 ± 2,3 ^b	29,8 ± 5,2 ^c	0

Los valores representan la media por tratamiento ± la desviación estándar. La significación estadística se expresa con superíndices. Sólo los valores con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$, prueba de LSD). Las mediciones fueron realizadas al término de la 4^{ta} semana del subcultivo. El diámetro del callo se midió por la parte de mayor anchura. La concentración de CFT utilizada fue de 150 µg/ml.

El control de la CFT sobre la contaminación fue apreciable. Ya desde el primer subcultivo sólo 8 microbrotes dieron positivos en el MCM, cifra que se redujo a 5 al término del 2^{do} ciclo. Importante resaltar que, como ya se mencionó con anterioridad, no se observó ninguna opacidad alrededor del brote, lo que no puede ser considerado como un signo del control completo de la contaminación, aunque sí fue un buen indicador. Igualmente la detección de otros 5 microbrotes con endófitos después del 2^{do} subcultivo indicaba, primero, la necesidad de aplicar un tratamiento descontaminante crónico, segundo, que es importante mantener la individualidad de los cultivos y, tercero, continuar con la vigilancia por medio de la inoculación de segmentos basales del brote en MCM. Luego del 4^{to} subcultivo, al comprobar que el material estaba saneado, se

suspendió el tratamiento con CFT. A partir de este punto los microbrotes mostraron un fenotipo vigoroso, sin signos ni síntomas de contaminación. No obstante se mantuvo un control constante sobre aquellos brotes que mostraban un decaimiento inexplicable, los que se extrajeron del esquema general de multiplicación *in vitro*.

Resumiendo, el protocolo de saneamiento implicaba:

1. La selección de aquella parte del brote con menor incidencia de contaminación, en este caso los extremos apicales.
2. Cultivo de los extremos apicales en un medio de cultivo suplementado con 150 µg/ml de CFT.
3. Utilización de un MCM como vía más segura de certificar el estado sanitario de un microbrote.
4. Mantenimiento del tratamiento hasta dos subcultivos extra después de no registrar ningún microbrote contaminado.
5. Mantenimiento de la individualidad de los cultivos hasta certificar el control de la contaminación.
6. Extracción del esquema de multiplicación de aquellos microbrotes que muestren una pérdida de vigor significativa, aunque no se observe ningún crecimiento microbiano o la aparición de opacidades a su alrededor.

Aplicando este protocolo se logró sanear el banco de germoplasma. En general, todos los genotipos necesitaron un mínimo de 4 subcultivos con CFT y 2 de ellos, el D15 y el D14, fueron tratados durante 8 ciclos. A pesar de este tratamiento tan prolongado, no se observaron efectos severos de fitotoxicidad, más allá de la aparición de ciertos síntomas de hiperhidricidad, los que desaparecieron luego de ser eliminada la CFT del medio de cultivo. Destacar que durante 3 años, momento en el que se sustituyeron los genotipos, no se observó ningún caso de re-emergencia generalizado. Con estas medidas de chequeo constante, tampoco se ha visto amenazado hasta la fecha el banco de germoplasma actual (compuesto por 17 genotipos) por causa de la aparición de endófitos.

4.1.3.2 Esquema de micropropagación

Para la micropropagación del nogal Paradox, tanto Driver y Kuniyuki (1984) como McGranahan *et al.* (1987) describen 4 etapas: la iniciación, la multiplicación, el enraizamiento y la aclimatación a condiciones *ex vitro*. El sistema propuesto para el nogal híbrido maderero se encuentra dividido en 5 fases, cada una con sus particularidades (**Fig. 13**). Aunque éste esquema es más complejo, garantiza no solo la

producción de plantas *in vitro* sino, y quizás más importante, la repetibilidad de los resultados.

Fig. 13 Esquema para la micropropagación *in vitro* del nogal híbrido maderero

La introducción y establecimiento *in vitro* del nogal híbrido maderero, aunque son etapas complejas en su ejecución, desde el punto de vista del resultado final, siguieron las mismas pautas que para otras especies: la obtención de cultivos viables y vigorosos. El éxito de la fase 1 radica en una suma de detalles que van desde la capacidad técnica del personal especializado, pasando por el método seguido para la obtención de la fuente de explante (fase 0) y del genotipo. En este caso no hubo posibilidad de elegir y se tuvo que partir necesariamente de árboles creciendo en condiciones de campo.

La proliferación, desde el enfoque de la obtención de un volumen de propágulo suficiente, no ha representado ningún reto importante respecto al resto de las etapas. Durante la misma se centró toda la atención en estabilizar los cultivos y producir microbrotes sanos y vigorosos, aptos, en principio, para iniciar el enraizamiento.

Definir un explante y un microbrote de calidad fue un paso hacia adelante para completar la micropropagación de los genotipos introducidos. Una vez que se había desarrollado la capacidad de reproducir el mismo tipo material durante cultivos sucesivos, se definió que, previo al inicio de la pre-inducción radical, el microbrote, además de mostrar un vigor manifiesto, no debía estar afectado por clorosis y/o marchitamiento, mucho menos mostrar el menor signo de defoliación, así como mantener un extremo apical en crecimiento activo (**Fig.14d**).

Fig. 14 Detalles sobre el tipo de explante a utilizar durante la proliferación *in vitro* (a-c) y morfología de un microbrote de calidad (d)

Durante la micropropagación suele existir una gran variabilidad entre los cultivos del mismo genotipo e incluso dentro de los microbrotes del mismo bote. La tendencia de esta variabilidad es a poseer un comportamiento gaussiano. Sin embargo la curtosis es muy variable dependiendo de la fuente de explante utilizada. Considerando que la morfología de un microbrote es la consecuencia de la suma de varios factores

independientes, controlándolos se podría influir, por ejemplo, sobre la altura y la capacidad rizogénica. Es improbable el control de todos los factores que inciden en la expresión de un carácter, al menos los más importantes; para éstos se confió en la aleatorización en la ejecución de los experimentos. No obstante sí se puede influir sobre otros, como la elección del tipo de explante a utilizar. Por estas razones se decidió emplear únicamente para la fase de PAE explantes apicales sanos y vigorosos, con aproximadamente 10 mm de longitud, portando 4 a 6 yemas, incluida la apical (**Fig. 14b**). Para la proliferación se destinarían preferentemente segmentos nodales también sanos y vigorosos, con 2 yemas activas como mínimo (**Fig. 14c**). El uso de explantes muy grandes (más de 15 mm) suele no ser adecuado, afectándose el crecimiento, la calidad y la uniformidad de los cultivos.

Como ha sido analizado anteriormente, si durante la multiplicación fue irrelevante para el objetivo perseguido qué parte del microbrote es utilizada para el subcultivo, durante la fase previa al enraizamiento utilizar un único tipo de explante permitió un mejor control y una menor heterogeneidad de los cultivos, obteniéndose como resultado una mayor repetibilidad de los resultados, facilitando a su vez la extracción de conclusiones aprovechables.

Un momento crítico de la micropropagación del género *Juglans*, junto con el establecimiento *in vitro* (fase 1), se produce durante el enraizamiento (fase 3), pues normalmente los nogales son bastante recalcitrantes a la formación de raíces. Este comportamiento condiciona en gran medida el éxito de la aclimatación.

Se desconocen cuáles son las causas exactas por las que algunos genotipos tienen menor capacidad rizogénica que otros. Obviando el factor genético, algunos detalles podrían apuntar hacia el estado fisiológico de los microbrotes en el momento de pasar a fase de enraizamiento como la principal causa. Por ejemplo Bisbis *et al.* (2003) señalan que la aplicación exógena de auxinas sirvió como señal para el inicio de la lignificación y que la formación de las raíces requieren del aumento continuo de la acumulación de ésta en los brotes de nogal. Como se analizará en el capítulo **4.1.3.2.3**, el enraizamiento parece estar influenciado por la edad del microbrote. A pesar de que existe bastante unanimidad en cuanto a qué tipo material debe ser utilizado para iniciar el enraizamiento (McGranahan *et al.* 1987), hay bastante ambigüedad en la definición de las condiciones necesarias para producir microbrotes de calidad enraizables.

El subcultivo previo a la pre-inducción radical, bien podría considerarse como una fase independiente cuyo principal propósito sería el pre-acondicionamiento de los microbrotes, buscando incrementar su capacidad rizogénica. No obstante, esta sub-fase

se continuará incluyendo dentro de la fase 2 a pesar de poseer objetivos diferentes e incluir ligeras modificaciones en el medio de cultivo respecto a la multiplicación, una vez que su manejo es similar.

A lo largo de esta investigación no se pudo asociar la capacidad de enraizamiento y la supervivencia con ningún marcador morfológico del microbrote. No obstante, sí se utilizaron criterios tecnológicos durante el trasplante que permitieron fijar la altura mínima del microbrote en alrededor de 20 mm. Algunos autores hacen referencia al tamaño del microbrote, aludiendo a una mayor cantidad de reservas en los más grandes y que esto tiene una influencia determinante sobre la rizogénesis y la reducción de la mortalidad (Chenevard *et al.* 1995). Otros, sin embargo, no mencionan ninguna razón para escoger un tipo de microbrote u otro, como McGranahan *et al.* (1987) quienes utilizan sin mayores distinciones microbrotes de nogal Paradox directamente de la multiplicación de entre 3 y 10 cm. Igualmente, Tetsumura *et al.* (2002), solo sugieren que lo más adecuado es utilizar microbrotes del nogal Shinano de más de 20 mm para iniciar el enraizamiento.

En la fase de endurecimiento (fase 4), se pudo comprobar que, independientemente que el microbrote estuviera enraizado, si éste poseía algún daño apical o manifestaba signos de defoliación era incapaz de sobrevivir. Al respecto, McGranahan y Leslie (1988) habían señalado que el mantenimiento del tamaño del explante (refiriéndose a la uniformidad de los microbrotes) y la retención de las hojas por parte de éstos fue importante para la supervivencia y el crecimiento de dos variedades de nogal europeo.

Por estas razones se definió que, durante la fase de la pre-inducción radical o PAE sólo se utilizarían microbrotes que tuvieran como mínimo una longitud de 20 mm, con aspecto vigoroso, sin ningún daño apreciable y un sistema foliar saludable, de color verde intenso, sin signos de marchitez y defoliación (Fig. 14d).

4.1.3.2.1 Introducción y establecimiento *in vitro*

Al tener que partir de árboles adultos únicos, creciendo condiciones de campo, se hizo extremadamente complejo diseñar experimentos para definir una metodología de introducción *in vitro*. Como se discutirá más adelante, la componente genética es determinante durante esta etapa. No obstante, como el propósito de esta investigación es definir un protocolo comercial para la producción masiva de nogal, se decidió atender más a la generalidad que a la particularidad. Este es un principio que guio el trabajo y se hará referencia a él reiteradamente.

El proceso establecimiento *in vitro* de los árboles plus fue en extremo complejo y culminó con la imposibilidad de lograr cultivos viables de la mayoría ellos. Los nogales son

considerados como especies recalcitrantes al cultivo de tejidos. Este término se refiere a la incapacidad de las células, tejidos y órganos para responder al cultivo *in vitro* (Benson 2000). Si el éxito de cualquier proyecto de micropropagación depende en gran medida de tener la posibilidad de producir plantas completas a partir de material *in vitro*, trabajar con una especie recalcitrante hace más incierto su resultado final. McCown (2000), en una revisión sobre la recalcitrancia de especies leñosas y herbáceas perennes, expresa que es especialmente frustrante que ésta esté determinada genéticamente y que es difícil su control manejando el ambiente o manipulando las condiciones del microcultivo.

Dentro el esquema de micropropagación del nogal, existen dos fases en extremo complejas. En orden prioritario estas son: el establecimiento *in vitro* y el enraizamiento. A diferencia del enraizamiento, sobre el proceso de introducción y establecimiento *in vitro* existen escasas referencias en la literatura. Es frecuente no ofrecer ninguna información sobre esta fase o simplemente mencionar que se parte de material pre-establecido. En cualquier caso es complicado extraer conclusiones de los pocos trabajos publicados. Por ejemplo, Revilla *et al.* (1989) describieron un protocolo de desinfección y selección de material de *J. regia* a partir de plantines germinados en condiciones de invernadero, aunque sin ofrecer ninguna información sobre sus resultados. Al igual que los autores anteriores, también han sido descritos métodos de desinfección para brotes tiernos creciendo bajo condiciones controladas en nogal Shinano (Tetsumura *et al.* 2002) y nogal negro (Bosela y Michler 2008), pero tampoco aportan mayores detalles sobre el establecimiento. McGranahan y Leslie (1988) introdujeron material juvenil proveniente de condiciones de campo aunque el método descrito fue de escasa utilidad para las selecciones de nogal híbrido maderero.

Era conocido que el material de partida ofrecía pocas oportunidades de éxito pues se trataba de ejemplares únicos, con cierto grado de adultez, creciendo en condiciones de campo. Ante esta situación, las perspectivas eran encontrar serios problemas para la eliminación de los contaminantes externos, la emisión profusa de sustancias fenólicas al medio de cultivo y el colapso del material vegetal unas vez superadas las dos dificultades anteriores, como ya había señalado McGranahan *et al.* (1987).

Se diseñó una primera estrategia que partía de utilizar brotes epicórmicos y/o chupones, capaces de soportar una desinfección severa. El utilizar este tipo de material garantizaba partir de material rejuvenecido, pero al crecer en condiciones de campo se debía elegir una época en la que el efecto contaminante de la lluvia fuera el mínimo

posible, por lo que se decidió recolectar las ramas en los meses de Junio y Julio. Un resumen del método de verano aparece reflejado en la **Fig. 15**.

Fig. 15 Esquema abreviado del proceso de introducción in vitro de nogal durante los meses de verano. Selección de los árboles plus y recolección del material de partida (a), traslado al laboratorio y procesamiento de las muestras (b y c), desinfección (d) e inoculación en el medio de cultivo (e)

En la **Tabla 12** aparecen reflejados los resultados de la campaña de introducción del 2008. Utilizando este método sólo se pudo establecer exitosamente el 6,6% de los explantes introducidos. Sin embargo el resultado más impactante fue que de 30 genotipos sólo 7 rindieron cultivos viables, a pesar de que 25 de ellos superaron la primera fase del establecimiento. La mayor cantidad de pérdidas durante las primeras 2 semanas estuvo asociada con la contaminación microbiana, aunque, en general, las

muerter fueron las mayores causantes de las bajas, especialmente durante la parte final del establecimiento.

Tabla 12 Resultados de la introducción *in vitro* de nogal híbrido maderero durante la campaña de verano del 2008

Gen.	Número Introd. ^a	Total Exp.	CB	%	CF	%	Muertos ^b	%	Establecidos	%	Muertos ^c	%
DA	3	59	33	55,9	5	8,5	0	0,0	15	25,4	6	10,2
DB	2	42	6	14,3	9	21,4	11	26,2	0	0,0	16	38,1
DC	3	67	12	17,9	2	3,0	17	25,4	0	0,0	36	53,7
DD	3	51	4	7,8	12	23,5	17	33,3	0	0,0	18	35,3
DE	2	36	11	30,6	4	11,1	3	8,3	0	0,0	18	50,0
DF	2	39	22	56,4	6	15,4	2	5,1	0	0,0	9	23,1
DG	1	15	0	0,0	0	0,0	15	100,0	0	0,0	0	0,0
DH	2	32	20	62,5	2	6,3	10	31,3	0	0,0	0	0,0
DL	2	36	20	55,6	2	5,6	2	5,6	0	0,0	12	33,3
DM	2	35	7	20,0	15	42,9	1	2,9	6	17,1	6	17,1
DO	3	66	4	6,1	10	15,2	30	45,5	0	0,0	22	33,3
D01	1	20	6	30,0	5	25,0	0	0,0	0	0,0	9	45,0
D12	1	20	13	65,0	1	5,0	6	30	0	0,0	0	0,0
D15 ^(d)	1	122	37	30,3	2	1,6	3	2,5	35	28,7	45	36,9
D16	1	22	10	45,5	0	0,0	12	54,5	0	0,0	0	0,0
D20	1	20	7	35,0	3	15,0	2	10,0	0	0,0	8	40,0
D48	2	40	10	25,0	15	37,5	2	5,0	1	2,5	12	30,0
D49	3	63	24	38,1	6	9,5	0	0,0	9	14,3	24	38,1
D50	3	63	10	15,9	3	4,8	23	36,5	0	0,0	30	47,6
D51	2	42	15	35,7	3	7,1	17	40,5	5	11,9	2	0,0
D52	4	73	17	23,3	7	9,6	27	37,0	0	0,0	22	30,1
D53	1	21	2	9,5	4	19,0	0	0,0	12	57,1	3	14,3
D54	2	41	4	9,8	18	43,9	0	0,0	0	0,0	19	46,3
D55	3	55	5	9,1	13	23,6	6	10,9	0	0,0	21	38,2
D56	2	37	12	32,4	6	16,2	4	10,8	0	0,0	15	40,5
D57	2	33	3	9,1	2	6,1	26	78,8	0	0,0	2	6,1
D58	1	16	10	62,5	2	12,5	4	25,0	0	0,0	0	0,0
D59	1	20	6	30,0	0	0,0	6	30,0	0	0,0	8	40,0
D62	3	58	36	62,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	22	37,9
D63	2	20	5	25,0	5	25,0	0	0,0	0	0,0	10	50,0
Total	61	1264	371	29,4	162	12,8	246	19,5	83	6,6	393	31,1

CB, contaminados con bacterias. CF, contaminados con hongos.

- (a) Cada introducción implicaba la recogida de material directamente de los árboles
(b) Estas muertes se refieren básicamente a pérdidas por la emisión de sustancias fenólicas aunque como generalmente estaban asociadas con otros tipos de exudados era muy difícil determinar la causa exacta de la muerte
(c) Estas se producían durante el establecimiento y estaban asociadas a la presencia y/o detección de bacterias. La detección se realizó inoculando segmentos del callo basal en un MCM
(d) Se tomaron las muestras de material clonal en plantación, no del árbol padre

Un análisis más detallado de los resultados permite encontrar datos llamativos. El genotipo DG no sobrepasó la primera semana, demostrando su absoluta incapacidad para el cultivo *in vitro*, máxime cuando ninguno de los explantes mostró el menor síntoma de contaminación. Por otro lado, otros genotipos, como el DH, el DL, el D58 y

el D62 estuvieron muy afectados por la presencia de bacterias, en general, causa principal del fracaso del establecimiento. Mientras que, es de destacar que las pérdidas en el DM, el D54 y el D48 estuvieron provocadas principalmente por los hongos, más que por las bacterias. De estos resultados se sugiere la existencia de una componente genética que podría determinar el éxito de la desinfección y el control de la contaminación microbiana.

La presencia de microorganismos endófitos es un fenómeno ubicuo de las plantas, los que residen de forma latente o colonizan los tejidos vegetales (Hallman *et al.* 1997). Rosenblueth y Martínez-Romero (2006) ofrecieron un listado de especies de las que han sido aislados bacterias endófitas, abarcando desde monocotiledóneas hasta dicotiledóneas, y de tipos tan diferentes de plantas como herbáceas y leñosas. Al igual que las bacterias, también se han encontrado hongos colonizando los tejidos internos de los árboles (Uterseher 2011). La existencia de una flora microbiana latente o adquirida sugiere una asociación y/o interacción directa con el hospedero, en este caso la planta. Una gran diversidad de tipos y poblaciones diferentes han sido encontradas entre genotipos y partes de la planta para varias especies, entre ellas, algodón (Adams y Kloepper 2002), trigo (Conn y Franco 2004) y chopo (Yrjälä *et al.* 2010). Además de organismos endófitos, también han sido aisladas bacterias epifíticas (Yrjälä *et al.* 2010). Al actuar las plantas como reservorios naturales de microorganismos, hace pensar que la eliminación de éstos no es una tarea tan simple como podría pensarse en un principio, constituyendo en muchos casos esta problemática la causa principal del fracaso de la micropropagación. Al respecto, McGranahan *et al.* (1987) expresan que la contaminación latente en árboles maduros de *J. regia* imposibilita su establecimiento *in vitro*.

Otros factores, relacionados estrechamente con el hospedero, podrían hacer que la respuesta a la desinfección sea considerada genotipo-dependiente. La cutícula es una estructura que cubre la superficie de los órganos aéreos de las plantas. Esta está compuesta por cutina o suberina, co-depositándose junto con ceras, ejerciendo funciones de protección. La cutícula posee varios patrones de cristalización, composición química y abundancia relativa que puede cambiar con la edad, el estado de desarrollo de la planta y el ambiente (Jenks y Ashworth 1999). También se han reportado diferencias genéticas incluso entre especies del mismo género. Al respecto Yeats *et al.* (2012) encontraron grandes diferencias en la arquitectura y el espesor de la cutícula del fruto entre varias especies salvajes de tomate.

El éxito de un protocolo de desinfección radica en poder acceder a los microorganismos que se encuentran debajo de la cutícula, causando el menor daño posible a los tejidos

vegetales. Cambios en la estructura y grosor de la cutícula podrían dificultar entonces la penetración de agentes químicos desinfectantes, provocando así una respuesta genotípica. La probable existencia de una flora microbiana propia de cada genotipo, unida a diferentes patrones diferenciales de formación y acumulación de cutícula podrían ser los causantes de la diversidad de respuestas ante el método de desinfección utilizado; aunque no se puede descartar la influencia también de factores ambientales.

Fig. 16 Resultados de la introducción in vitro de explantes de nogal. (a) Contaminación bacteriana. (b) Contaminación fúngica. (c) Explante que no respondió positivamente al cultivo in vitro. (d) Explante establecido exitosamente durante la introducción de verano. Obsérvese, señalado con una flecha, el calo basal formado debajo de la yema axilar brotada. (e) Explantes establecidos exitosamente durante la introducción de invierno-primavera. (f) Distintos grados de oxidación fenólica en las introducciones de verano. (g) Resultados del cultivo de segmentos basales de los explantes en MCM

A pesar del efecto adverso provocado por los microorganismos, el mayor inconveniente afrontado con este método de introducción *in vitro* fue la emisión de sustancias fenólicas

al medio de cultivo (**Fig. 16f**). Los fenoles están compuestos por uno o varios anillos bencénicos, así como la presencia de uno o varios grupos hidroxilos unidos a ellos, lo que les confiere un alto poder reductor. Dentro de la célula vegetal, los fenoles actúan como aceptores de electrones, sirven además como sustrato de enzimas oxidativas, protegiendo así de la inactivación por oxidación de sustancias, como el AIA (de Klerk *et al.* 1999, de Klerk *et al.* 2011, da Silva *et al.* 2013). También están involucrados en la defensa ante el ataque de patógenos. Al seccionar el tejido vegetal durante la introducción, una gran cantidad de sustancias fenólicas, dependiendo del genotipo, son liberadas. El efecto de la oxidación se manifiesta inicialmente como el ennegrecimiento o la decoloración del medio de cultivo, continuando con la necrosis de la parte basal del explante y, en muchos casos, culmina con la muerte de éste. La oxidación fenólica podría no tener consecuencias para el cultivo *in vitro* pero para algunas especies de plantas y genotipos es la causa principal del decaimiento y la pérdida del explante. McGranahan *et al.* (1987) alertan que la emisión de sustancias al medio de cultivo y el oscurecimiento letal (haciendo referencia a la oxidación fenólica) son unas de las principales causas del fracaso del cultivo de tejidos del nogal.

A pesar de que no siempre fue evidente comprobar a simple vista la existencia de oxidación fenólica, los cambios bruscos de la coloración del medio de cultivo fueron un buen indicador de su ocurrencia. En este sentido, se encontró una amplia diversidad de comportamientos (**Fig. 16f**). Ya desde el momento previo a la inoculación se observó que algunos genotipos, como el DG y el D57, eran capaces incluso de teñir de amarillo el agua de enjuague, por lo que era necesario cambiarla continuamente hasta el momento de colocarlos en el medio de cultivo. Para estos dos casos fue necesario realizar el subcultivo cada 24 horas durante las primeras dos semanas; aun así ninguno de los dos genotipos pudo ser establecido: los daños provocados por la oxidación fenólica y los sucesivos subcultivos durante el inicio de la introducción fueron tan severos que los explantes terminaron por morir por esta causa. Otros genotipos, como el D16 y el D51, también estuvieron afectados por la emisión de fenoles, aunque en una menor extensión. En general, durante las primeras 5 ó 6 semanas fue imprescindible realizar el subcultivo cada 2 ó 3 días, dependiendo del genotipo y del estado del explante. Britton *et al.* (2007) también recomiendan que después de la introducción es esencial una transferencia rápida (2 a 5 veces por semana) en los casos donde se observe una decoloración del medio de cultivo hasta que ésta ya no sea evidente. Este procedimiento implicaba grandes inconvenientes por su laboriosidad e incrementaba el peligro de la contaminación por manipulación. No obstante, la principal dificultad estaba asociada con la escasa efectividad del método, que si bien es cierto permitió establecer

in vitro varias decenas de genotipos entre los años 2006 y el 2010, fue imposible obtener cultivos viables para la mayoría de ellos.

Asumiendo que la oxidación fenólica es presumiblemente la causa principal de la muerte del material introducido y que de los resultados alcanzados se desprende la existencia de una probable relación genética, varios autores han reportado diferentes niveles de acumulación y producción de sustancias fenólicas entre variedades de la misma especie de nogal europeo (Solar *et al.* 2006, Pereira *et al.* 2007). El coctel de fenoles presente en diferentes partes y estaciones del año es amplio y variado. Al respecto Stampar *et al.* (2006) determinaron la presencia de hasta 13 compuestos fenólicos en nogal, siendo el más importante la juglona. Igualmente, Solar *et al.* (2006) y Pereira *et al.* (2007) encontraron picos diferenciales de acumulación de derivados fenólicos, dependiendo de la época del año. Lo que indica la necesidad de escoger, para especies como el nogal, épocas en las que la producción de estas sustancias sea menos profusa.

Debido a las limitaciones asociadas a este método de introducción, se dirigió la atención hacia una alternativa más efectiva. La nueva propuesta debería incluir la utilización de material juvenil formado bajo condiciones semi-controladas, como habían recomendado Bonga y Von Aderkas (1992). Para ello se modificó el procedimiento descrito por Vieitez *et al.* (1993) para la obtención de material juvenil de *Quercus rubra* L. para el inicio del cultivo de tejidos. Utilizando este protocolo, como promedio, a las 3 semanas comienza la brotación de las yemas (**Fig. 17b**). Luego de 7 a 10 días los brotes alcanzan un desarrollo suficiente (**Fig. 17c**) como para soportar el proceso de esterilización y dar inicio al establecimiento *in vitro*.

En la **Tabla 13** se observan los resultados de la introducción en la campaña de invierno-primavera del año 2011. Las pérdidas por contaminación bacteriana fueron en su conjunto similares a las registradas con el anterior protocolo de introducción; aunque hubo una mayor afección por causa de los hongos en relación con el método de verano, cuando justo cabría esperar la respuesta contraria. Sin embargo el hecho de encontrarse las varetas en un ambiente húmedo y aplicar una desinfección más ligera a los brotes fueron las probables causas de la creación de un ambiente más propicio para el aumento de la densidad del inóculo, primero, y, segundo y más probable, una deficiente eliminación de los hongos.

Por otro lado, se redujo el número de muertes casi 3 veces respecto las introducciones de verano, especialmente durante la fase inicial del establecimiento. Con este protocolo se aumentó la efectividad de la introducción, duplicándose no solo el porcentaje de explantes establecidos con éxito (13,5%) sino también incrementándose el número de

genotipos establecidos (9 de 12). Importante es que con este método se superó la incapacidad de algunos árboles (DE, DL, D16 y D63) para obtener cultivos viables con las introducciones de verano. Sin embargo el factor genético continuó predominando sobre el método utilizado, pues algunos genotipos no pudieron ser establecidos, a pesar de partir de un material más rejuvenecido. El caso más llamativo ha sido el del árbol D101, que por sus características sería deseable clonar pero luego de 4 campañas de introducción ha sido imposible obtener cultivos viables de él.

Fig. 17 Esquema abreviado del proceso de introducción in vitro de nogal durante los meses de invierno-primavera. Selección de los árboles plus y recolección del material de partida (a), estimulación de la brotación de las yemas dormantes (b) estado idóneo de los brotes para la desinfección (c) e inoculación en el medio de cultivo. En el panel (d) obsérvese un brote establecido, vigoroso y en crecimiento activo

Importante destacar que con las introducciones de invierno-primavera los explantes no mostraron los signos típicos de la emisión de sustancias fenólicas al medio de cultivo (**Fig. 16e**). Esta fue la probable causa de la reducción de la mortalidad respecto a las introducciones de verano y clave del éxito alcanzado. El hecho de no estar afectados por la oxidación fenólica permitió espaciar los subcultivos, de 2 a 3 días, a 1 semana durante el primer mes y medio de iniciada la introducción, facilitándose así la logística del proceso y mejorándose el control del mismo.

Tabla 13 Resultados de la introducción in vitro de nogal híbrido durante la campaña de invierno-primavera del 2011

Gen	Número Introd. ^a	Total Exp.	CB	%	CF	%	Muertos ^b	%	Establecidos	%	Muertos	%
DA	3	46	14	30,4	8	17,4	3	6,5	19	41,3	2	4,3
DE	3	54	30	55,6	6	11,1	4	7,4	7	13,0	7	13
DL	3	38	10	26,3	12	31,6	0	0	2	5,3	14	36,8
DN	2	26	8	30,8	1	3,8	0	0	15	57,7	2	7,7
D16	2	21	10	47,6	4	19	0	0	1	4,8	6	28,6
D48	3	31	6	19,4	4	12,9	1	3,2	13	41,9	7	22,6
D53	3	56	21	37,5	14	25	2	3,6	16	28,6	3	5,4
D63	1	6	3	50	0	0	0	0	3	50	0	0
D120	1	29	14	48,3	7	24,1	1	3,4	0	0	7	24,1
D101	3	28	3	10,7	8	28,6	5	17,9	0	0	12	42,9
GR14	1	11	2	18,2	2	18,2	0	0	0	0	7	63,6
Q3	1	26	11	42,3	9	34,6	3	11,5	4	15,4	8	30,8
Total	39	594	188	31,6	146	24,6	41	6,9	80	13,5	139	23,4

(a) Sólo se recolectó material en condiciones de campo una vez. El número de introducciones se refiere a las veces que colectaron los brotes de las estacas

(b) En ningún caso se observó la emisión de fenoles u otro tipo de sustancia al medio de cultivo

Para ambos métodos de introducción, todos aquellos explantes contaminados, tanto por bacterias como por hongos, fueron descartados inmediatamente (**Fig. 16a-b**). Antes de pasar a la segunda fase del establecimiento, una pequeña porción de la parte basal del callo de todos los explantes que continuaban en el establecimiento era inoculada en el MCM para certificar la presencia, o no, de microorganismos (**Fig. 16g**). Los brotes que resultaban negativo al cultivo en MCM y se mostraban vigorosos podían ser cultivados en conjunto, mientras que los que manifestaban algún síntoma de decaimiento se mantenían de forma individualizada hasta estar seguros de que la falta de vigor no estaba asociada con la presencia de contaminantes microbianos. Sin embargo, algunos brotes eran incapaces de adaptarse al cultivo de tejido, aun estando limpios, y terminaban muriendo. Como característica importante, éstos no formaban el callo basal (**Fig. 16c**), requisito fundamental para un crecimiento vigoroso (**Fig. 17d**). Una vez que un genotipo mostraba tasas de multiplicación estables, generalmente por encima de 3,

se encontraban listos para pasar a la siguiente etapa de la micropropagación: la multiplicación. Al respecto, McGranahan y Leslie (1988), señalaban que transcurridos unos 3 ó 4 meses de la introducción de cultivares adultos de nogal Persa, la tratabilidad de los cultivos mejoraba considerablemente, haciendo referencia a una menor sensibilidad a los requerimientos sobre el tamaño de los explantes y una mayor capacidad para sostener intervalos largos de subcultivo; traduciéndose esto en una mejor habilidad para multiplicarse.

4.1.3.2.2 Multiplicación y pre-acondicionamiento para el enraizamiento. Ensayos en las fases 2 y 3

En esta sección se describirán todos los ensayos destinados a optimizar y adaptar al híbrido maderero los protocolos de micropropagación descritos para el género *Juglans*. En este sentido, los esfuerzos estuvieron encaminados a diseñar una metodología de propagación *in vitro* para el nogal híbrido maderero que pudiera convertirse en una tecnología de propagación comercial.

Con el objetivo de evitar el montaje de experimentos multifactoriales muy complejos, solo se consideraron 2 factores a la vez, dentro de los cuales el genotipo se mantuvo inamovible. Siempre que las condiciones lo permitieron, el siguiente experimento se puso en ejecución únicamente cuando estaba suficiente probado el efecto del factor de variación anterior.

Siendo que la repetibilidad de los resultados es una de las principales problemáticas durante la micropropagación de especies recalcitrantes como lo son los nogales, se definieron inicialmente una serie de elementos que condicionaban el manejo y que solo eran alteradas cuando los resultados y los análisis estadísticos así lo demostraban.

Los ensayos que a continuación se describirán centraron su atención en:

1. la obtención de microbrotes de calidad que tuvieran la capacidad de formar raíces y de sobrevivir la fase *ex vitro*,
2. la creación de las condiciones adecuadas para que estos microbrotes pudieran expresar su capacidad rizogénica y
3. que fueran capaces de soportar las condiciones de aclimatación y el trasplante a condiciones de campo

4.1.3.2.3 Efecto de la densidad de inóculo y la edad del microbrote sobre el crecimiento in vitro y su influencia sobre el enraizamiento

Existen algunos detalles, *a priori*, irrelevantes, sobre los que existen pocas referencias en la literatura pero que tienen una gran influencia sobre el comportamiento *in vitro* y en

algunos casos son decisivas para la obtención de los resultados deseados, como se discutirá a continuación. No siempre los procedimientos complicados (variaciones de la formulación del medio de cultivo, concentraciones y combinaciones hormonales diversas, entre los ensayos más comúnmente realizados) solucionan problemas difíciles. Determinar los requerimientos básicos para la micropropagación de cualquier especie (elección del contenedor adecuado, volumen de medio de cultivo a utilizar, cantidad de explantes inoculados por contenedor, la duración del subcultivo, entre otros) suelen ser considerados detalles superfluos que normalmente son asumidos como irrelevantes. El diseño y la ejecución de experimentos hormonales complejos son habituales en el cultivo de tejidos sin embargo el éxito de los mismos depende en gran medida del manejo que se realiza. McGranahan y Leslie (1998) habían ya indicado que el cultivo exitoso de material adulto de nogal fue logrado modificando el manejo de los explantes y de las técnicas de cultivo más que alterando la composición de los medios de cultivo.

Lograr cultivos uniformes fue un objetivo necesario para poder ensayar y modelar el protocolo de micropropagación de una población genéticamente heterogénea, perteneciente a un género tan recalcitrante como lo es el *Juglans*. Habiéndose establecido la fuente de explante más adecuada para la fase de PAE, se debía eliminar la arbitrariedad en la utilización de una densidad de inóculo y una edad del microbrote para iniciar una fase tan complicada como es la de estimulación y formación de raíces.

Normalmente la fase previa al enraizamiento se incluye como parte de la multiplicación y se denomina elongación. En general la elongación no es necesaria pero en casos muy concretos resulta de gran importancia, a pesar de que puede convertirse en un inconveniente para la micropropagación comercial (George 1993). La elongación tiene como propósito producir brotes lo suficientemente grandes y adecuados para el enraizamiento (George 1993). En el presente trabajo, con la inclusión y diferenciación de ésta subfase, más que la longitud del explante se buscaba crear las condiciones necesarias para que los microbrotes expresaran su capacidad rizogénica y superaran la aclimatación.

Pocas referencias existen sobre las modificaciones de las condiciones físico-químicas en las fases previas al enraizamiento *in vitro* de nogal, únicamente Leslie *et al.* (2005) sugieren que la utilización de PG durante la multiplicación de híbridos porta injertos de nogal mejora considerablemente el enraizamiento. La mayoría de los autores que han trabajado en la micropropagación del nogal no reportan ninguna variación en el manejo antes de iniciar el enraizamiento, haciendo referencia básicamente a utilizar microbrotes con una longitud determinada pero sin ofrecer detalles de cómo obtenerlos.

McGranahan *et al.* (1987) recomiendan iniciar el enraizamiento del nogal Paradox con brotes vigorosos de 3 a 10 cm de longitud provenientes de la fase de multiplicación. La altura parece ser el criterio predominante que determina la calidad del microbrote, sin embargo, Vahdati *et al.* (2004) concluyeron que el tamaño de éstos no ejerce ninguna influencia sobre el enraizamiento. Estos mismos autores señalan que por el contrario ésta podría ser una ventaja al tener la posibilidad de poder utilizar microesquejes de pequeño tamaño, producidos más rápidamente, lo que aumentaría la eficiencia de la micropropagación. No obstante, terminan por afirmar que los resultados de la mortalidad en el invernadero lo desaconsejaba pues los microbrotes de menor longitud poseían menor cantidad de reservas y los tallos se encontraban menos lignificados, reduciéndose así su capacidad de supervivencia.

En cuanto a la edad de los brotes, ésta suele ser muy variable. Navatel y Bourrian (2001) empleaban microbrotes de *J. regia* L. en proliferación subcultivados cada 5 semanas; mientras que Jay-Allemand *et al.* (1992) y Saadat y Hennerty (2002) utilizaban microbrotes de 3 y 4 semanas en multiplicación, respectivamente. A manera de resumen, Dolcet-Sanjuan *et al.* (2004) recomiendan usar para el enraizamiento de diversos genotipos de nogal microbrotes de 3 a 5 cm de longitud provenientes directamente de la multiplicación y subcultivados cada 3 semanas. Para el nogal híbrido maderero, emplear brotes de menos de 4 semanas para iniciar el enraizamiento fue inviable, debido no solo al pequeño tamaño que alcanzaban muchos de los genotipos con que se trabajaba, sino también por causa de su pronunciado estado vegetativo, lo que podría constituir un factor negativo para la rizogénesis y la supervivencia.

Coincidiendo con otros autores (McGranahan *et al.* 1987, Jay-Allemand *et al.* 1992, Vahdati *et al.* 2004, Leslie *et al.* 2006), los resultados del análisis estadístico revelaron que el genotipo es el factor más importante, explicando la mayor parte de la varianza total durante las fases de multiplicación (67,3%) y el enraizamiento (85,6%). Como el genotipo es un factor sobre el que no se podía influir, el análisis se centrará únicamente en los efectos de la densidad del inóculo y en la edad del microbrote como moduladores de ambas fases.

Como era de esperar la existencia de una mayor disponibilidad de componentes del medio de cultivo por explante inoculado resultó en un estímulo para el crecimiento durante la multiplicación (**Tabla 14**). Para los 4 genotipos utilizados, la menor longitud se alcanzó cuando se inocularon 10 explantes/contenedor, siendo especialmente llamativo en el clon DA, para el que ésta se reduce aproximadamente 1 cm respecto a cuándo se parte de 6 explantes/contenedor. Si se fija el tamaño de los microbrotes en un mínimo de 20 mm para ser utilizados en la fase de enraizamiento, el

aprovechamiento también mejora considerablemente al inocular 6 y 8 explantes/contenedor. No siendo la tasa de multiplicación un problema a medio plazo, el porcentaje de microbrotes del que se podría disponer para iniciar el enraizamiento determinará en gran medida la eficiencia de una metodología destinada a convertirse en un protocolo comercial. Al no encontrar ningún reflejo apreciable sobre el enraizamiento para ninguna de las densidades de inóculo utilizadas, **se consideró que en general utilizar una relación de 10 ml de medio de cultivo/explante podría ser adecuada para la multiplicación, especialmente en la fase previa al inicio del enraizamiento.**

Tabla 14 Efecto sobre el crecimiento de diferentes densidades de inóculo durante la fase de multiplicación y su influencia sobre el enraizamiento

Genotipo	Densidad Inóculo ^(a)	Longitud Microbrote (mm)	Microbrotes >20mm (%)	Microbrotes >25mm (%)	Enraizamiento (%)	Raíces/ Microbrote
DA	6	34,8 ± 4,7 ^c	98,5 ± 8,2 ^b	94,8 ± 8,7 ^c	79,4 ± 1,9 ^a	3,1 ± 1,0 ^a
	8	29,2 ± 3,0 ^b	97,1 ± 6,6 ^b	80,2 ± 9,3 ^b	90,1 ± 7,9 ^a	2,8 ± 0,6 ^a
	10	26,0 ± 3,0 ^a	88,8 ± 5,7 ^a	62,3 ± 5,7 ^a	89,5 ± 5,7 ^a	2,8 ± 0,5 ^a
D49	8	23,6 ± 2,3 ^b	76,1 ± 5,7 ^a	41,5 ± 3,2 ^a	0,0	0,0
	10	20,0 ± 1,7 ^a	76,9 ± 8,7 ^a	21,3 ± 2,2 ^b	0,0	0,0
D53	6	35,6 ± 5,9 ^c	94,8 ± 6,1 ^a	87,5 ± 6,1 ^b	30,0 ± 5,7 ^a	1,3 ± 0,6 ^a
	8	31,5 ± 3,4 ^b	94,8 ± 3,6 ^a	81,8 ± 6,6 ^{ab}	42,5 ± 8,2 ^a	1,8 ± 1,0 ^a
	10	29,2 ± 3,4 ^a	92,3 ± 4,8 ^a	74,4 ± 4,3 ^a	33,8 ± 6,1 ^a	1,5 ± 0,7 ^a
D117	6	22,6 ± 2,5 ^b	71,7 ± 8,7 ^b	38,6 ± 5,2 ^b	0,0	0,0
	8	20,9 ± 1,3 ^{ab}	58,4 ± 2,2 ^a	28,2 ± 1,4 ^{ab}	0,0	0,0
	10	20,0 ± 1,5 ^a	51,5 ± 2,5 ^a	21,3 ± 1,4 ^a	0,0	0,0

Los valores representan la media por tratamiento ± la desviación estándar. La significación estadística se expresa con superíndices. Sólo los valores con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$, prueba de LSD). (a) Se utilizó un mismo volumen de medio de cultivo (80 ml), variando únicamente la cantidad de explantes inoculados. Las evaluaciones para la fase de multiplicación se realizaron al término de la 5^{ta} semana del subcultivo, mientras que para el enraizamiento se efectuaron después de 3 semanas de iniciada la expresión. Fueron utilizados únicamente explantes apicales al inicio de los cultivos. La fuente de hierro empleada fue FeEDDHA. El medio de cultivo de multiplicación se suplementó con 0,4 mM de PG. En la fase de pre-inducción radical se utilizó como fuente de carbono la sacarosa (58,0 mM), mientras que durante la expresión ésta se sustituyó por fructosa (83,2 mM)

Con el incremento de la edad aumentó también la longitud del microbrote y, lo que es más importante, la uniformidad de los cultivos, permitiendo mejorar la eficiencia del proceso al poder disponer de un mayor número de microbrotes que pasaría a la fase de enraizamiento (**Tabla 15**). El genotipo sigue siendo el factor determinante, sin embargo manejar el momento del subcultivo tuvo una gran influencia sobre el comportamiento *in vitro*. Aunque sólo dos genotipos fueron capaces de formar raíces, los resultados demuestran que la edad del microbrote resultó relevante sobre la expresión de la capacidad rizogénica del nogal híbrido *in vitro*. El clon DA alcanzó un mayor porcentaje de enraizamiento demorando el subcultivo 6 semanas (94,3%). Por su parte el D53

mostró una completa incapacidad para enraizar cuando se utilizaron microbrotes de 4 semanas de edad, dando un salto significativo sólo 7 días después, al alcanzar un 34,7% de microbrotes con raíces.

Tabla 15 Efecto sobre el crecimiento de varios momentos del subcultivo (edad del microbrote) en la fase de proliferación y su influencia sobre el enraizamiento *in vitro*

Genotipo	Edad Microbrote (semanas)	Longitud Microbrote (mm)	Microbrotes >20mm (%)	Microbrotes >25mm (%)	Enraizamiento (%)	Raíces/ Microbrote
DA	5	29,9 ± 4,8 ^a	93,4 ± 6,6 ^a	76,9 ± 8,7 ^a	76,1 ± 3,2 ^a	2,8 ± 0,7 ^a
	6	32,1 ± 5,7 ^a	99,3 ± 7,1 ^b	92,3 ± 11,1 ^b	94,3 ± 3,9 ^b	3,1 ± 0,7 ^a
D49	4	21,3 ± 2,1 ^a	69,9 ± 4,8 ^a	31,9 ± 4,8 ^a	0,0	0,0
	5	22,3 ± 3,1 ^a	83,3 ± 8,2 ^b	30,0 ± 3,6 ^a	0,0	0,0
D53	4	27,2 ± 1,8 ^a	89,5 ± 3,9 ^a	68,0 ± 2,2 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
	5	33,3 ± 5,5 ^b	92,8 ± 6,1 ^{ab}	77,8 ± 4,8 ^a	34,7 ± 5,7 ^b	1,4 ± 0,7 ^b
	6	33,2 ± 4,9 ^b	96,0 ± 4,3 ^b	88,2 ± 6,6 ^b	35,7 ± 7,6 ^b	1,6 ± 0,9 ^b
D117	5	20,7 ± 1,1 ^a	52,5 ± 1,4 ^a	26,4 ± 1,4 ^a	0,0	0,0
	6	21,2 ± 2,2 ^a	63,3 ± 5,2 ^a	29,1 ± 3,6 ^a	0,0	0,0

Los valores representan la media por tratamiento ± la desviación estándar. La significación estadística se expresa con superíndices. Sólo los valores con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$, prueba de LSD). (a) Se inocularon 8 explantes en 80 ml de medio de cultivo. Las evaluaciones para la fase de enraizamiento se efectuaron después de 3 semanas de iniciada la expresión. Fueron utilizados únicamente explantes apicales al inicio de los cultivos. La fuente de hierro utilizada fue FeEDDHA. El medio de cultivo de multiplicación se suplementó con 0,4 mM de PG. En la fase de pre-inducción radical se utilizó como fuente de carbono la sacarosa (58,0 mM), mientras que durante la expresión ésta se sustituyó por fructosa (83,2 mM)

A diferencia de la densidad de inóculo, la edad del microbrote sí ejerció una acción moduladora sobre el enraizamiento del nogal híbrido madero. Resultados similares han sido reportados en *Quercus robur* (Sanchez *et al.* 1996) y *Gossypum hirsutum* L. (Ouma *et al.* 2004). La relación entre el enraizamiento, la acumulación de lignina y la edad del microbrote podría ser el origen de este comportamiento. Fu *et al.* (2011) encontraron durante el enraizamiento *in vitro* de peonías cambios en la actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL) así como diferencias en el contenido de fenoles totales entre genotipos fáciles y difíciles de enraizar. Santos Macedo *et al.* (2012) también observaron en explantes de olivo tratados con AIB un aumento significativo en la acumulación de fenoles totales, flavonoides y lignina previo a la iniciación radical. Por su parte, en nogal Persa, se ha determinado que la acumulación de lignina fue menor en la población de brotes que no mostró signos visibles de enraizamiento (Bisbis *et al.* 2003). Al mismo tiempo, la acumulación de lignina está asociada con el envejecimiento. En regenerantes micropropagados de *Morus nigra* L. las cantidades de lignina aumentaron con la edad (Đurković *et al.* 2012). Igualmente los microtallos de gardenia *in vitro* muestran un incremento en el contenido de lignina durante la formación de la raíz del día 0 al día 20 del inicio de la inducción (Hatzilazarou *et al.* 2006). Es bastante

probable entonces que la incapacidad de los microbrotes del D53 para formar raíces durante la 4^{ta} semana del subcultivo esté relacionada una escasa deposición de lignina en la base del tallo. Igual razonamiento podría ser utilizado para explicar las diferencias encontradas entre el enraizamiento alcanzado en la 5^{ta} y la 6^{ta} semana para el genotipo DA.

Siendo así, se estableció que en la etapa previa al inicio del enraizamiento (PAE) se utilizarían únicamente segmentos apicales, manteniendo una relación de medio de cultivo por explante de 10:1, además de retrasar el subcultivo hasta la 6^{ta} semana.

4.1.3.2.4 Determinación de la concentración de sacarosa más adecuada durante la pre-inducción radical

Los osmolitos, como la sacarosa, tienen una gran influencia sobre el potencial hídrico del medio de cultivo. Éstos, además de actuar como fuente de carbono, ayudan en la determinación de la respuesta morfogénica (George 1993). Únicamente Vahdati *et al.* (2004) probaron el efecto de varias concentraciones de sacarosa (20, 30, 40 y 60 g/L) sobre el enraizamiento, concluyendo que los mejores resultados se alcanzaron con 40 g/L. Por su parte McGranahan *et al.* (1987) recomiendan suplementar la formulación DKW-C con 53 mg/L de sacarosa durante ésta subfase para el género *Juglans*; sin embargo existen pocas coincidencias en trabajos posteriores. Por ejemplo, Pijut (1997) reportan el empleo de 1,5% de sacarosa para el enraizamiento de *J. cinérea*; mientras que Scaltsoyiannes *et al.* (1997) utilizaron 40 g/L para varios genotipos de *J. regia* y Ashrafi *et al.* (2010) emplean 30 g/L de sacarosa durante la pre-inducción en *J. regia*.

Una vez más el análisis de varianza reveló que el genotipo se localiza muy por encima del efecto modulador de la concentración de sacarosa utilizada; existiendo una respuesta condicionada por la interacción entre ambos factores. Con las dosis extremas de sacarosa (58 y 175 mM) se registran en general los peores resultados respecto al porcentaje de enraizamiento, dependiendo del genotipo (**Tabla 16**). Los casos más contrastantes se observan con los clones DA y DM, en ese orden. Para el DA, con la concentración de 175 mM se reduce el enraizamiento casi a la mitad respecto al mejor tratamiento (45,3 vs 81,3%); sin embargo en el DM, sucede exactamente lo contrario: la concentración de 175 mM es mucho mejor (98,7%) que la de 58 mM (69,0%). Para los otros dos genotipos no existen diferencias estadísticas entre los niveles de sacarosa utilizados. Un comportamiento semejante se registró para la cantidad de raíces por microbrote y para la longitud de la raíz más larga. Excepto para el clon D53, con la menor concentración se alcanzaron los peores resultados en cuanto a la cantidad de

microbrotes con raíces. Coincidentemente, Vahdathi *et al.* (2004) determinaron que el enraizamiento *in vitro* de un genotipo de nogal para fruta (*J. regia* L. var. Chandler) fue óptimo cuando utilizaron 40 (117 mM) y 60 (175 mM) g/L de sacarosa durante la pre-inducción, aunque no observaron ninguna influencia sobre la calidad y el número de raíces. De manera diferente, la longitud de la vitroplanta se vio favorecida por el nivel intermedio de sacarosa (117 mM) excepto para el clon DA. En general, el mayor número de raíces y las raíces más largas se formaron en presencia de 175 mM de sacarosa.

Tabla 16 Influencia de tres concentraciones de sacarosa durante la pre-inducción sobre el enraizamiento y el crecimiento de diferentes genotipos de nogal híbrido maderero

Genotipo	Sacarosa (mM)	Enraizamiento (%)	Raíces/ Microbrote	Longitud de la Raíz ^(a) (mm)	Longitud de los Microbrotes (mm)
DA	58	73,1 ± 6,6 ^b	2,6 ± 0,7 ^{ab}	18,3 ± 7,4 ^b	32,4 ± 3,3 ^b
DA	117	81,3 ± 7,8 ^b	3,0 ± 0,8 ^b	19,1 ± 8,8 ^b	30,8 ± 2,1 ^a
DA	175	45,3 ± 7,5 ^a	2,1 ± 0,7 ^a	15,1 ± 6,9 ^a	31,6 ± 3,4 ^b
DM	58	69,0 ± 7,4 ^a	1,8 ± 0,6 ^a	15,7 ± 6,7 ^a	18,7 ± 3,2 ^a
DM	117	90,9 ± 10,2 ^b	2,8 ± 0,6 ^b	19,0 ± 7,9 ^b	19,2 ± 4,1 ^a
DM	175	98,7 ± 8,9 ^b	4,7 ± 1,1 ^c	26,9 ± 8,1 ^c	18,6 ± 3,8 ^a
D51	58	54,7 ± 4,6 ^a	2,1 ± 0,3 ^a	11,7 ± 5,5 ^a	35,8 ± 1,8 ^a
D51	117	57,4 ± 8,8 ^a	2,2 ± 0,6 ^a	12,7 ± 5,2 ^{ab}	37,1 ± 3,4 ^b
D51	175	59,5 ± 9,2 ^a	2,9 ± 0,4 ^a	15,3 ± 4,9 ^b	35,1 ± 2,5 ^a
D53	58	75,7 ± 6,7 ^a	3,2 ± 0,9 ^a	22,3 ± 8,7 ^a	32,7 ± 4,3 ^a
D53	117	73,0 ± 5,4 ^a	3,4 ± 0,5 ^a	29,2 ± 9,1 ^b	35,2 ± 4,1 ^b
D53	175	74,3 ± 6,6 ^a	3,6 ± 0,5 ^a	28,5 ± 8,3 ^b	32,3 ± 5,4 ^a

Los valores representan la media por tratamiento ± la desviación estándar. La significación estadística se expresa con superíndices. Sólo los valores con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$, prueba de LSD). Se inocularon 8 explantes en 80 ml de medio de cultivo durante la proliferación y la duración del subcultivo fue de 6 semanas. Las evaluaciones para la fase de enraizamiento se efectuaron después de 3 semanas de iniciada la expresión, excepto para el clon DA que se hicieron durante la 2^{da}. Fueron utilizados únicamente explantes apicales al inicio de los cultivos. La fuente de hierro utilizada fue FeEDDHA. El medio de cultivo de multiplicación se suplementó con 0,4 mM de PG. En la fase de expresión se utilizó fructosa (83.2 mM) como fuente de carbono. (a) Se refiere a la longitud de la raíz más larga.

Incorporar estos resultados a un protocolo comercial, teniendo presente lograr siempre el mejor resultado posible, se antojaba impracticable pues complicaría en demasía una tecnología ya de por sí compleja, al tener que personalizar los medios de cultivo dependiendo del genotipo. Por ello que se decidió sacrificar la obtención del mejor comportamiento individual en favor del conjunto de los genotipos, facilitándose así el posible escalado comercial. A pesar de que la supervivencia parece está estrechamente ligada a la capacidad de enraizamiento y al número de raíces formadas, como se analizará en los capítulos 4.1.3.2.5 y 4.1.3.2.7, esta relación no pudo ser establecida matemáticamente. **Siendo así, el medio de cultivo de pre-inducción se suplementaría con 117mM de sacarosa.**

4.1.3.2.5 Efecto del Florogucinol sobre la multiplicación, el enraizamiento y la supervivencia

Habiéndose fijado el uso de 117 mM de sacarosa en la fase de pre-inducción radical, se ejecutó un experimento para determinar, primero, si el PG tendría alguna influencia sobre el comportamiento *in vitro* del nogal híbrido maderero, segundo, si era posible establecer cuál era la concentración más adecuada para la proliferación y, tercero, determinar su repercusión sobre las fases sucesivas. Para todos los genotipos analizados, se encontró que el comportamiento de los microbrotes mejoró considerablemente con la adición de PG en el medio de cultivo de proliferación (**Tabla 17**). De todas las variables evaluadas, el efecto sobre el tamaño del callo fue particularmente llamativo. Con respecto a los explantes no tratados, las ganancias de biomasa oscilaron entre aproximadamente dos veces, con 0,2 mM, a cinco, con 0,8 mM. También se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los explantes tratados y no tratados para la longitud de los entrenudos, los nudos por microbrote y la longitud del microbrote. Las respuestas observadas eran en gran parte dependiente de la dosis, registrándose los efectos más pronunciados sobre el crecimiento con las concentraciones más altas. Las razones exactas que podrían explicar los efectos del PG en el cultivo *in vitro* aún son poco comprendidas (da Silva *et al.* 2013). Se ha reportado su uso, y el de otros compuestos fenólicos estructuralmente similares, para promover procesos tan diversos como el aumento de la proliferación en la papa (Sarkar y Naik 2000), estimulación de la inducción de brotes en *Capsicum annuum* (Kumar *et al.* 2005), mejoramiento de la embriogénesis somática en *Feijoa sellowiana* (Reis *et al.* 2008) o la corrección de la hiperhidricidad en manzano (Rustaei *et al.* 2009). Igualmente se han reportado efectos adversos derivados del uso del PG sobre la proliferación *in vitro* y el enraizamiento. Por ejemplo, Siwach y Rani Gill (2011) observaron una declinación pronunciada de los cultivos de *Ficus religiosa* L. al suplementar el medio de cultivo con 100 mg/L de PG. Otros autores, como Ainsley *et al.* (2001) y de Klerk *et al.* (2011) también han señalado una acción sinérgica entre el PG y algunas fitohormonas.

Los resultados aquí presentados son indicativos de que el PG tiene un efecto beneficioso sobre la multiplicación del nogal híbrido maderero, bajo las condiciones aquí descritas (**Fig. 18**). En comparación con el material sin tratar, la diferencia observable más sorprendente fue la inflamación de la parte del explante en contacto con el medio de cultivo. Este cambio fue perfectamente detectable a partir de 5^{to} día del inicio del subcultivo, especialmente en los tratamientos donde se emplearon concentraciones por encima de 0,2 mM, al observarse el inicio de la formación de una masa callosa.

Tabla 17 Efectos de diferentes concentraciones de PG sobre el crecimiento in vitro de nogal híbrido maderero durante la multiplicación y su influencia sobre el enraizamiento y la supervivencia

Gen.	PG (mM)	Peso del callo basal (g)	Longitud de los Microbrotes (mm)	Nudos/ Microbrotes	Enraizamiento (%)	Raíces/ Microbrotes	Supervivencia (%)
DA	0	0,37 ± 0,007 ^a	26,7 ± 7,6 ^a	9,1 ± 0,9 ^a	84,4 ± 9,2 ^c	3,5 ± 0,4 ^b	69,9 ± 6,5 ^b
	0,2	0,56 ± 0,011 ^b	30,5 ± 2,9 ^b	9,7 ± 2,2 ^a	81,1 ± 3,3 ^c	4,8 ± 0,3 ^c	64,2 ± 8,8 ^b
	0,4	0,89 ± 0,017 ^c	38,2 ± 6,2 ^d	11,1 ± 1,8 ^b	83,5 ± 4,0 ^c	2,9 ± 0,7 ^{ab}	29,3 ± 8,6 ^a
	0,6	0,99 ± 0,014 ^d	40,1 ± 4,4 ^c	11,0 ± 1,6 ^b	53,6 ± 5,6 ^b	2,2 ± 0,2 ^a	32,0 ± 7,4 ^a
	0,8	1,17 ± 0,017 ^e	41,2 ± 3,4 ^c	11,4 ± 0,6 ^b	33,3 ± 8,9 ^a	2,4 ± 0,6 ^a	28,8 ± 5,3 ^a
DE	0	0,19 ± 0,008 ^a	19,4 ± 5,0 ^a	1,9 ± 0,2 ^a	82,1 ± 6,6 ^c	2,1 ± 0,7 ^a	68,6 ± 5,7 ^c
	0,2	0,33 ± 0,011 ^b	22,6 ± 6,5 ^a	2,5 ± 0,4 ^b	71,5 ± 7,9 ^b	2,5 ± 0,4 ^a	54,1 ± 8,8 ^b
	0,4	0,53 ± 0,018 ^c	35,5 ± 3,3 ^b	2,3 ± 0,7 ^{ab}	68,0 ± 4,2 ^b	3,4 ± 0,6 ^b	44,5 ± 5,1 ^b
	0,6	0,78 ± 0,015 ^d	38,2 ± 7,6 ^b	2,6 ± 0,6 ^b	43,3 ± 6,5 ^a	2,6 ± 0,4 ^a	29,9 ± 6,4 ^a
	0,8	N. E.	N. E.	N. E.	N. E.	N. E.	N. E.
DM	0	N. E.	N. E.	N. E.	N. E.	N. E.	N. E.
	0,2	0,22 ± 0,003 ^a	17,6 ± 4,3 ^a	6,6 ± 0,7 ^a	N. E.	N. E.	N. E.
	0,4	0,29 ± 0,012 ^b	21,4 ± 1,3 ^b	7,2 ± 1,1 ^b	N. E.	N. E.	N. E.
	0,6	0,29 ± 0,039 ^b	20,9 ± 2,4 ^b	7,5 ± 0,6 ^b	N. E.	N. E.	N. E.
	0,8	0,38 ± 0,009 ^c	20,8 ± 1,6 ^b	7,5 ± 0,5 ^b	N. E.	N. E.	N. E.
DN	0	0,16 ± 0,003 ^a	19,6 ± 2,9 ^a	7,4 ± 0,3 ^a	81,1 ± 10,3 ^d	1,9 ± 0,4 ^a	79,0 ± 9,1 ^c
	0,2	0,28 ± 0,011 ^b	21,5 ± 0,9 ^a	8,1 ± 1,1 ^b	60,1 ± 7,0 ^c	2,1 ± 0,3 ^a	71,8 ± 5,2 ^{bc}
	0,4	0,46 ± 0,009 ^c	25,5 ± 1,2 ^b	9,4 ± 1,0 ^c	53,5 ± 4,9 ^{bc}	2,0 ± 0,2 ^a	60,3 ± 8,3 ^b
	0,6	0,55 ± 0,008 ^d	30,6 ± 3,8 ^c	9,7 ± 1,2 ^c	43,8 ± 9,9 ^a	2,9 ± 0,8 ^b	41,6 ± 7,3 ^a
	0,8	0,76 ± 0,015 ^b	36,7 ± 5,6 ^d	10,3 ± 1,3 ^d	43,1 ± 7,7 ^a	2,3 ± 0,6 ^{ab}	42,7 ± 4,4 ^a
D15	0	0,22 ± 0,010 ^a	21,1 ± 7,2 ^a	1,8 ± 0,4 ^a	92,1 ± 10,6 ^c	2,0 ± 0,5 ^a	78,8 ± 7,7 ^c
	0,2	0,43 ± 0,014 ^b	32,6 ± 4,5 ^b	3,6 ± 0,4 ^b	89,5 ± 7,1 ^c	2,9 ± 0,8 ^{bc}	84,3 ± 5,8 ^c
	0,4	0,63 ± 0,017 ^c	36,9 ± 9,3 ^b	3,3 ± 0,3 ^b	70,0 ± 8,1 ^b	3,2 ± 1,1 ^c	54,5 ± 9,7 ^b
	75	0,82 ± 0,022 ^d	42,1 ± 6,8 ^c	3,6 ± 0,9 ^b	58,7 ± 5,6 ^a	2,6 ± 0,8 ^{ab}	33,3 ± 4,4 ^a
	0,8	N. E.	N. E.	N. E.	N. E.	N. E.	N. E.
D48	0	0,14 ± 0,007 ^a	16,4 ± 2,2 ^a	5,9 ± 0,7 ^a	72,6 ± 5,2 ^a	1,9 ± 0,4 ^a	79,0 ± 6,8 ^c
	0,2	0,33 ± 0,016 ^b	21,4 ± 4,9 ^b	7,7 ± 1,3 ^b	61,4 ± 6,1 ^a	2,6 ± 0,9 ^b	61,2 ± 8,6 ^b
	0,4	0,55 ± 0,013 ^c	23,7 ± 2,7 ^c	8,5 ± 0,9 ^c	61,4 ± 8,2 ^a	2,7 ± 0,5 ^b	44,6 ± 8,1 ^a
	0,6	0,64 ± 0,012 ^d	22,5 ± 3,8 ^{bc}	8,5 ± 1,0 ^c	55,4 ± 7,3 ^a	2,3 ± 0,6 ^{ab}	N. E.
	0,8	0,65 ± 0,016 ^d	22,7 ± 4,5 ^{bc}	8,7 ± 0,9 ^c	N. E.	N. E.	N. E.
D51	0	0,25 ± 0,010 ^a	23,4 ± 5,9 ^a	8,8 ± 1,5 ^a	74,5 ± 6,8 ^c	1,1 ± 0,3 ^a	56,2 ± 9,5 ^c
	0,2	0,48 ± 0,013 ^b	29,0 ± 6,6 ^b	9,8 ± 0,5 ^b	59,9 ± 9,5 ^b	1,5 ± 0,9 ^a	44,4 ± 10,4 ^b
	0,4	0,80 ± 0,020 ^c	36,6 ± 3,3 ^c	10,6 ± 0,7 ^c	14,5 ± 3,1 ^a	1,7 ± 0,4 ^a	17,7 ± 5,6 ^a
	0,6	1,04 ± 0,016 ^d	41,9 ± 7,5 ^d	11,0 ± 1,2 ^{cd}	N. E.	N. E.	N. E.
	0,8	1,17 ± 0,024 ^e	41,8 ± 4,3 ^d	11,3 ± 1,6 ^d	N. E.	N. E.	N. E.
D53	0	0,14 ± 0,007 ^a	13,9 ± 4,1 ^a	6,3 ± 2,2 ^a	95,2 ± 9,3 ^b	3,1 ± 0,5 ^a	36,3 ± 6,9 ^b
	0,2	0,52 ± 0,015 ^b	29,2 ± 3,8 ^b	9,1 ± 0,9 ^b	84,1 ± 7,1 ^{ab}	3,7 ± 1,3 ^a	30,6 ± 10,1 ^{ab}
	0,4	0,72 ± 0,020 ^c	35,0 ± 7,1 ^c	9,9 ± 0,9 ^c	55,4 ± 6,1 ^a	2,7 ± 1,0 ^a	19,4 ± 7,4 ^a
	0,6	0,89 ± 0,020 ^d	36,9 ± 6,2 ^c	10,1 ± 0,6 ^c	66,2 ± 1,7 ^a	3,3 ± 1,8 ^a	N. E.
	0,8	1,11 ± 0,017 ^e	43,8 ± 4,2 ^d	10,2 ± 0,4 ^c	N. E.	N. E.	N. E.
D117	0	0,12 ± 0,005 ^a	14,1 ± 2,3 ^a	7,8 ± 0,4 ^a	75,9 ± 10,0 ^c	2,3 ± 0,2 ^{ab}	77,7 ± 7,3 ^d
	0,2	0,32 ± 0,010 ^b	23,8 ± 3,3 ^b	8,7 ± 0,7 ^b	66,7 ± 8,1 ^c	2,0 ± 0,8 ^a	61,6 ± 4,4 ^c
	0,4	0,53 ± 0,019 ^c	31,4 ± 3,8 ^c	10,4 ± 0,9 ^c	50,1 ± 2,8 ^b	2,8 ± 1,1 ^b	31,7 ± 6,7 ^b
	0,6	0,73 ± 0,013 ^d	33,6 ± 5,8 ^{cd}	10,5 ± 0,3 ^c	41,1 ± 7,4 ^b	2,7 ± 0,7 ^b	23,1 ± 10,7 ^b
	0,8	0,90 ± 0,023 ^e	37,7 ± 6,3 ^d	10,9 ± 0,5 ^c	11,1 ± 3,4 ^a	1,8 ± 0,5 ^a	0,0 ± 0,0 ^a

Los valores representan la media ± la desviación estándar. La significación estadística se expresa con superíndices. Sólo los valores con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$, prueba de LSD). Durante la multiplicación 8 explantes apicales fueron inoculados por bote (580 cm³ de capacidad). El peso del callo se calculó como el promedio por contenedor. El crecimiento de los microbrotes se evaluó durante la 6^{ta} semana del subcultivo, mientras que el enraizamiento se evaluó después de 3 semanas y la supervivencia luego de 6 semanas desde el inicio de la aclimatación. N. E. tratamiento no evaluado. En la fase de pre-inducción radical se utilizó como fuente de carbono sacarosa (117,0 mM), mientras que durante la expresión ésta se sustituyó por glucosa (83.2 mM)

Fig. 18 Efectos del PG sobre el crecimiento *in vitro* de los microbrotes de nogal híbrido maderero. (a-e) Microbrotes del genotipo D53 cultivados en presencia de diferentes concentraciones de PG: 0; 0,2; 0,4; 0,6 y 0,8 mM, respectivamente. (f) Secuencia de los callos basales obtenidos de microbrotes de los genotipos D53 (línea superior) y D15 (línea inferior) creciendo en presencia de varios niveles de PG: 0; 0,2; 0,4; 0,6 y 0,8 mM, respectivamente. Las observaciones fueron realizadas al término de la 6^{ta} semana del subcultivo. Se utilizó como fuente de hierro FeEDDHA

Los callos basales quedaron casi completamente formados al término de la segunda semana de cultivo, punto a partir del cual el crecimiento del brote comenzó a hacerse evidente. Dos hechos sugieren que la formación de un callo basal es fundamental para el crecimiento de los microbrotes: (i) los únicos explantes que pudieron ser establecidos *in vitro* exitosamente eran los que forman callos basales visibles; y (ii) durante la multiplicación, hubo una correlación positiva entre la longitud del microbrote y el tamaño del callo ($r=0,89$ para 64 mediciones). Driver y Kuniyuki (1984), al respecto de la

importancia de la formación de un callo basal, habían llegado a la misma conclusión durante el establecimiento *in vitro* del nogal Paradox.

Aunque la concentración de PG más alta ensayada (0,80 mM) fue la más eficaz en promover el crecimiento, era frecuente que los microbrotes mostraran signos de deficiencias nutricionales acompañados de manchas necróticas en las hojas y defoliación ocasional al final de la 6^{ta} semana del subcultivo. Favorecer un mayor crecimiento y desarrollo, unido a un más que probable agotamiento de las reservas nutritivas, podría ser el origen del efecto indirecto del uso de 0,80 mM en el medio de cultivo. Siwach y Rani Gill (2011) también reportaron la defoliación de los microbrotes de *Ficus religiosa* L. cuando eran cultivados en presencias de 100 mg/L (0,80 mM) de PG.

Para encontrar una concentración adecuada para el objetivo perseguido, es decir, el desarrollo de un protocolo eficiente para la propagación masiva de nogal, se analizaron también los efectos del PG sobre el enraizamiento *in vitro* y la supervivencia. Como se refleja en la **Tabla 17**, la adición de este compuesto al medio de cultivo redujo la capacidad de enraizamiento de los microbrotes del nogal híbrido maderero. Los porcentajes de enraizamiento para los microbrotes no tratados oscilaron entre 72,6% (D48) y 95,2% (53), pero estos valores disminuyeron significativamente tras la exposición a PG. Aunque algunos genotipos fueron más sensibles que otros, los efectos más adversos se observaron generalmente con las concentraciones más altas, resultando en consecuencia en tasas de enraizamiento muy bajas. Es evidente que el PG tuvo un efecto perjudicial sobre la rizogénesis del nogal híbrido maderero en las condiciones aquí descritas. Sin embargo, Leslie *et al.* (2005) reportaron un efecto estimulante sobre el enraizamiento de híbridos portainjertos de nogal al suplementar el medio de multiplicación con 1 mM PG, previo a la fase de pre-inducción radical. Sharifian *et al.* (2009) también coincidieron en que añadir 0,5 y 1 mM de PG en la fase de proliferación es beneficioso para el enraizamiento de 3 variedades de nogal Persa aunque el efecto estuvo más determinado por el genotipo. Estas divergencias podrían estar sustentadas en el uso de diferentes genotipos y condiciones de cultivo diferentes, como causas probables de tales contradicciones. En línea con esta idea, da Silva *et al.* (2013) describen varios casos en los que se han reportado efectos aparentemente contradictorios para el PG y otros compuestos fenólicos. De hecho, han sido encontradas respuestas divergentes al tratamiento con PG en diferentes cultivares de manzano (Zimmerman 1984). Curiosamente, de Klerk *et al.* (2011) también observaron diferentes efectos del PG en el enraizamiento de una variedad de manzano en función de la auxina aplicada.

La mortalidad de las vitroplantas de nogal híbrido maderero durante la aclimatación estuvo determinada en gran medida por el genotipo y la concentración de PG utilizada; explicando ambos factores juntos el 79,1% de la varianza total. No obstante, los análisis estadísticos no señalaron ninguna significación para la interacción genotipo-concentración de PG para el nogal híbrido maderero.

Partiendo de la hipótesis de que la supervivencia depende de la capacidad de enraizamiento del microbrote, no se encontró, sin embargo, ninguna correlación clara entre la mortalidad y el número de raíces formadas. Pero se pudo comprobar para los nueve genotipos que las vitroplantas con una sola raíz tienen una mayor probabilidad de morir que aquellas con dos o más raíces.

En general, la tasa de supervivencia fue mayor cuando los microbrotes se cultivaron sin PG; registrándose una reducción drástica de ésta al utilizar concentraciones de PG por encima de 0,20 mM. **Aunque, obviamente, se necesita más investigación, estos resultados demuestran que las concentraciones moderadas de PG durante la multiplicación (0,4 mM) y previo al inicio de la pre-inducción radical (0,2 mM) contribuyen a promover significativamente el comportamiento *in vitro* del nogal híbrido maderero, sin afectar la eficiencia del enraizamiento y la supervivencia de una manera sustancial.**

4.1.3.2.6 Efecto de la sustitución del FeEDTA por FeEDDHA como fuente de hierro sobre la multiplicación y el enraizamiento

La fuente de hierro más comúnmente utilizada para la micropropagación de las especies del género *Juglans* es el FeEDTA. La presencia de clorosis de los cultivos *in vitro* de nogal es un fenómeno recurrente señalado por varios autores como McGranahan *et al.* (1987) y Ashrafi *et al.* (2010). Esta suele estar asociada generalmente con la deficiencia de hierro, como se ha demostrado en *Rosa* híbrida (Van der Salm *et al.* 1994), avellano (Nas y Read 2001) y la frambuesa roja (Zawadzka y Orlikowska 2009). A pesar de ello, esta ha sido una problemática poco abordada en la micropropagación del nogal y es la probable causa de algunos malos resultados, como se analizará más adelante, al menos para el nogal híbrido maderero.

En la concentración usada normalmente en el medio DKW-C (equivalente a 6,81 mg/L de Fe²⁺; McGranahan *et al.* 1987), el FeEDTA no impidió la aparición de clorosis para el nogal híbrido maderero en las condiciones descritas, por el contrario otros efectos adversos como defoliación, escaso crecimiento, muerte apical, incapacidad para enraizar, entre otras afectaciones, fueron observados (**Fig. 19**). Como se demostrará

más adelante la sustitución de este quelato, por uno más adecuado (FeEDDHA), fue decisiva para alcanzar los resultados aquí presentados.

Fig. 19 Resultados de la sustitución del FeEDTA (paneles de la derecha) por el FeEDDHA (paneles de la izquierda). (a-b) Microbrotes en la fase de proliferación durante la 4^{ta} semana del subcultivo. (c-d) Microbrotes antes del inicio de la pre-inducción. (e-f) Microbrotes enraizados previo al trasplante

El FeEDDHA es un quelato muy estable utilizado ampliamente en la agricultura para corregir las deficiencias de hierro, y por tanto la clorosis, influyendo además sobre la disponibilidad de otros microelementos y, en general, mejorando la nutrición de las plantas (Chaney y Giordano 1977, Juárez *et al.* 2001, Gil-Ortiz y Bautista-Carrascosa 2004).

En el cultivo de tejidos, el FeEDDHA ha demostrado ejercer una función similar, provocando además otros efectos beneficiosos. Al respecto, Van der Salm *et al.* (1994) habían demostrado que el FeEDTA es inactivado por causa de la luz, lo que provocaba una deficiencia de hierro en el medio de cultivo y sugerían su sustitución por el FeEDDHA, un quelato más fotoestable. Estos autores atribuyen el mejoramiento de los cultivos de *Rosa* híbrida precisamente al hecho de usar FeEDDHA en vez del FeEDTA. Así, Nass y Lee (2001) también encontraron que la fuente de hierro afectó significativamente la longitud de los brotes, el color y la morfología de las hojas en el cultivo *in vitro* de avellano. Igualmente, Zawadzka y Orlikowska (2009), comprobaron que los microbrotes de cinco variedades de frambuesa que crecieron en presencia de FeEDDHA eran más largos y tenían más hojas que cuando se cultivaban con FeEDTA. A pesar de que algunos autores han reportado efectos adversos sobre la morfogénesis *in vitro* de diferentes procesos (Shibli *et al.* 2002, Sotiropoulos *et al.* 2006), el objetivo fundamental de la introducción del FeEDDHA en la micropropagación del nogal híbrido maderero era corregir, en principio, la profusa clorosis que afectaba a los microbrotes; sin embargo, los efectos del cambio de quelato afectaron todas las etapas analizadas y las variables evaluadas.

Faltaba por dilucidar una interrogante ¿el mal comportamiento de los cultivos se debía a una deficiencia de hierro, al uso de un quelato inadecuado o a una combinación de ambas? Con tal propósito se diseñó un experimento con el que se pretendía encontrar una respuesta a la pregunta. Si los aportes de hierro del FeEDTA (Fsl) eran insuficientes bastaría entonces con incorporar una mayor cantidad de éste en el medio de cultivo (FsII). Por otro lado, utilizar una concentración reducida de FeEDDHA (Fcl) ayudaría a determinar si el problema se debía a que éste era un quelato más adecuado.

El aumento de los niveles de FeEDTA hasta 1,5 veces (FsII) no mejoró el comportamiento de los microbrotes; por el contrario se registraron reducciones significativas para la longitud promedio de los brotes y de los espacios internodales (**Tabla 18**). Además de continuarse observando clorosis, aun mayor que con la concentración recomendada en la formulación DKW-C (Fsl), los microbrotes manifestaron una severa defoliación al final de los subcultivos. Por su parte, el número de nudos por microbrote, no fue esencialmente afectado (excepto para el D15), sugiriendo que el exceso de FeEDTA bloquea la elongación de los entrenudos. En línea con esta idea, los niveles más altos de FeEDTA detuvieron casi por completo el crecimiento, especialmente para aquellos genotipos con menor longitud; reduciendo, y en algunos casos impidiendo, además la formación de callos basales grandes. El enraizamiento fue también claramente afectado por la utilización del FeEDTA. Con la

mayor concentración probada los microbrotes fueron incapaces por completo de formar raíces. Incluso la concentración más baja causó una reducción significativa en el porcentaje de enraizamiento, cayendo hasta el 8,2% para el clon DA.

Tabla 18 Efectos de dos quelatos de hierro y concentraciones diferentes sobre el crecimiento y el enraizamiento in vitro de microbrotes de nogal híbrido maderero

Genotipo	Fuente de Hierro & Concentración	Longitud del Microbrote (mm)	Nudos/ Microbrote	Enraizamiento (%)	Raíces/ Microbrote	Longitud de la Raíz (mm)
DA	Fsl	24,0 ± 4,5 ^b	10,5 ± 0,5 ^a	8,2 ± 2,3 ^a	1,1 ± 0,3 ^b	18,9 ± 6,3 ^b
	FsII	15,3 ± 2,1 ^a	10,9 ± 0,9 ^{ab}	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
	Fcl	29,8 ± 3,4 ^c	10,6 ± 0,7 ^a	77,0 ± 11,1 ^b	2,3 ± 0,5 ^c	31,9 ± 4,8 ^c
	FcII	39,2 ± 5,6 ^d	11,2 ± 1,1 ^b	88,8 ± 4,5 ^b	2,9 ± 0,4 ^c	34,3 ± 5,6 ^c
DE	Fsl	21,8 ± 3,2 ^a	8,3 ± 0,9 ^a	21,3 ± 4,1 ^b	1,6 ± 0,5 ^a	13,6 ± 3,3 ^b
	FsII	12,7 ± 2,2 ^a	9,9 ± 0,7 ^b	8,8 ± 1,9 ^a	1,1 ± 0,2 ^a	8,5 ± 1,2 ^a
	Fcl	33,3 ± 1,2 ^c	10,0 ± 0,8 ^b	53,3 ± 3,4 ^c	2,5 ± 0,6 ^b	16,6 ± 4,1 ^b
	FcII	36,1 ± 6,4 ^c	9,4 ± 0,5 ^b	59,8 ± 5,4 ^c	3,1 ± 0,9 ^b	25,5 ± 3,6 ^c
DM	Fsl	15,7 ± 2,2 ^a	9,4 ± 0,8 ^a	N. E.	N. E.	N. E.
	FsII	15,6 ± 1,5 ^a	10,3 ± 0,6 ^b	N. E.	N. E.	N. E.
	Fcl	20,0 ± 2,9 ^b	10,1 ± 0,8 ^b	23,3 ± 4,7 ^a	2,2 ± 0,8 ^a	23,5 ± 3,2 ^a
	FcII	21,9 ± 4,2 ^c	9,6 ± 0,4 ^a	45,9 ± 4,4 ^b	2,9 ± 1,1 ^a	29,0 ± 2,5 ^b
DN	Fsl	23,3 ± 1,6 ^a	N. E.	8,7 ± 4,3 ^a	1,1 ± 0,9 ^a	6,5 ± 6,0 ^a
	FsII	N. E.	N. E.	N. E.	N. E.	N. E.
	Fcl	N. E.	N. E.	N. E.	N. E.	N. E.
	FcII	24,1 ± 2,1 ^a	N. E.	31,9 ± 4,8 ^b	1,5 ± 0,6 ^a	14,1 ± 6,1 ^b
D15	Fsl	26,6 ± 3,1 ^b	7,2 ± 1,1 ^b	43,2 ± 7,6 ^a	1,3 ± 0,7 ^a	12,1 ± 7,0 ^a
	FsII	12,8 ± 5,8 ^a	4,3 ± 0,3 ^a	N. E.	N. E.	N. E.
	Fcl	30,1 ± 2,9 ^c	10,3 ± 0,9 ^c	74,4 ± 3,4 ^b	2,7 ± 0,4 ^b	19,5 ± 3,5 ^b
	FcII	37,9 ± 5,3 ^d	11,6 ± 0,5 ^d	91,5 ± 5,1 ^c	3,3 ± 0,4 ^b	27,3 ± 4,9 ^c
D48	Fsl	16,5 ± 3,6 ^a	6,9 ± 0,8 ^a	19,3 ± 8,6 ^a	1,4 ± 0,7 ^a	11,4 ± 3,4 ^a
	FsII	N. E.	N. E.	N. E.	N. E.	N. E.
	Fcl	N. E.	N. E.	N. E.	N. E.	N. E.
	FcII	22,3 ± 4,1 ^b	8,5 ± 0,8 ^b	62,2 ± 6,7 ^c	2,7 ± 0,9 ^b	21,8 ± 5,1 ^b
D51	Fsl	24,6 ± 4,4 ^b	9,7 ± 0,5 ^a	18,3 ± 8,4 ^b	1,9 ± 0,7 ^b	14,3 ± 2,4 ^b
	FsII	18,4 ± 5,1 ^a	11,1 ± 0,7 ^c	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
	Fcl	33,1 ± 2,9 ^c	10,8 ± 0,4 ^{bc}	66,6 ± 6,1 ^c	2,1 ± 2,2 ^b	21,8 ± 6,7 ^c
	FcII	37,7 ± 1,8 ^d	10,2 ± 0,5 ^{ab}	70,1 ± 5,8 ^c	1,9 ± 1,1 ^b	28,8 ± 8,3 ^d
D53	Fsl	31,2 ± 2,5 ^a	N. E.	54,5 ± 1,9 ^a	2,2 ± 0,9 ^a	20,5 ± 4,9 ^a
	FsII	N. E.	N. E.	N. E.	N. E.	N. E.
	Fcl	N. E.	N. E.	N. E.	N. E.	N. E.
	FcII	40,8 ± 1,9 ^b	N. E.	74,4 ± 4,3 ^b	3,1 ± 0,6 ^b	25,7 ± 6,1 ^b
D117	Fsl	17,8 ± 3,0 ^b	10,0 ± 0,7 ^a	11,5 ± 2,3 ^a	1,5 ± 0,7 ^a	14,3 ± 2,4 ^b
	FsII	14,8 ± 1,1 ^a	10,6 ± 0,7 ^b	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
	Fcl	26,1 ± 2,3 ^c	10,3 ± 0,6 ^b	32,6 ± 1,9 ^b	3,0 ± 1,3 ^b	24,5 ± 4,7 ^c
	FcII	31,4 ± 3,8 ^d	10,4 ± 0,9 ^b	50,1 ± 2,8 ^c	3,2 ± 1,1 ^b	31,7 ± 6,7 ^d

Los valores representan la media ± la desviación estándar. La significación estadística se expresa con superíndices. Sólo los valores con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$, prueba de LSD). Durante la multiplicación 8 explantes apicales fueron inoculados por bote (580 cm³ de capacidad). El crecimiento de los microbrotes se evaluó durante la 6ª semana del subcultivo, mientras que el enraizamiento se evaluó después de 3 semanas. N. E. tratamiento no evaluado. En la fase de pre-inducción radical se utilizó como fuente de carbono sacarosa (117,0 mM), mientras que durante la expresión ésta se sustituyó por glucosa (83,2 mM). Fsl (FeEDTA 6,81mg/L de Fe²⁺), FsII (FeEDTA 10,21 mg/L de Fe²⁺), Fcl (FeEDDHA 3,40 mg/L de Fe³⁺), FcII (FeEDDHA 6,81 mg/L de Fe³⁺)

Tales efectos adversos se revirtieron cuando el FeEDTA fue reemplazado por el FeEDDHA, mejorándose sustancialmente la calidad de los microbrotes para concentraciones comparables de hierro (Fsl vs FcII). Aun reduciéndose el contenido de

hierro del medio de cultivo (Fcl), la introducción del FeEDDHA favoreció el crecimiento y desarrollo de los microbrotes, resultando en microbrotes más grandes y saludables, sin ningún efecto deletéreo detectable, como clorosis, defoliación y muerte apical (**Fig. 19**). No todos los clones sufrieron el mismo grado de afección. El genotipo más sensible fue el DA, el que después de 6 semanas de cultivo, vio reducida su longitud media a la mitad en presencia de FeEDTA respecto a cuándo se usó el FeEDDHA (15,3 vs. 39,2 mm), ocurriendo lo mismo para la longitud de los entrenudos (1,42 vs. 3,46 mm).

Los efectos beneficiosos del FeEDDHA también se extendieron al enraizamiento. Como se resume en la **Tabla 18**, se registraron mejoras significativas sobre el porcentaje de microbrotes enraizados, el número de raíces por explante y también de la longitud de la raíz (**Fig. 19**). La elongación de los microbrotes también fue estimulada por este quelato durante la expresión radical (datos no mostrados).

En comparación con el FeEDTA, las vitroplantas obtenidas con FeEDDHA tuvieron un aspecto más saludable y vigoroso (**Fig. 19**). Los microbrotes cultivados en presencia de FeEDTA sufrían diferentes grados de defoliación, especialmente al final del subcultivo, previo al inicio de la pre-inducción radical. Aunque todos los genotipos mostraban estos signos en mayor o menor medida, algunos genotipos, como el D15, eran afectados por una defoliación severa, llegando a perder en ocasiones todas las hojas (**Fig. 19d**). Con el uso del FeEDDHA, además de corregirse la clorosis en presencia del FeEDTA, se eliminaron los problemas de defoliación prematura e incluso de muerte apical durante la proliferación, daño éste que afectó especialmente también al clon D15. Las razones de la superioridad de este quelato de hierro siguen siendo inciertas. Pero estos resultados son indicativos de que la forma en que se suministra hierro es claramente importante para la micropropagación de nogal híbrido maderero.

Estos resultados demuestran que una buena nutrición es una condición básica para la obtención de microbrotes de calidad y para el comportamiento durante todas las fases de la micropropagación. Para algunas leñosas, como el avellano (Nas y Read 2001), *Olea maderensis* (Brito y Santos 2009) y el nogal Persa (Ashrafi *et al.* 2010) también han sido necesarias modificaciones en la formulación medio de cultivo para producir microbrotes vigorosos.

El ANDEVA demostró que, al igual que para el PG, tampoco existió interacción estadística entre el genotipo y el tipo de quelato y concentraciones utilizados, lo que sin dudas significó un avance importante hacia el futuro escalado comercial, una vez que permite generalizar el uso del FeEDDHA durante la micropropagación

del nogal híbrido maderero. Igualmente se estableció que la concentración más adecuada de este quelato debería ser la equivalente (FcII) a la que se recomienda en la formulación del DKW-C.

4.1.3.2.6.1 Variaciones en el pH del medio de cultivo

Las mediciones de la acidez antes de ajustar el pH, indicaban que el FeEDTA tiene una tendencia a tornar los medios de cultivo más ácidos. Si se mantuviera este comportamiento a lo largo del período de cultivo ¿bastaría para explicar los resultados antes descritos?

Fig. 20 Variaciones del pH del medio de cultivo durante la fase de proliferación. Mediciones realizadas antes de ajustar el pH (BAj), después del autoclavado (AA) y a los 3, 6, 10, 20, 30 y 40 días

Como se ha señalado anteriormente, luego de preparados los medios de cultivo, y antes de ajustar el pH a 5,6, éste se situaba casi una unidad por debajo cuando se utilizó el FeEDTA, respecto a los que contenían FeEDDHA (**Fig. 20**). A pesar de que se registraron variaciones en el pH luego de ser ajustado, éstas fueron menos relevantes, volviendo a ser los más ácidos los medios de cultivo en los que se utilizaba el FeEDTA. Transcurridos solo 3 días de la inoculación, se observó una ligera disminución del pH, aunque esta reducción fue menos acusada en los medios de cultivo suplementados con 6,81 mg/L de Fe^{3+} en forma de FeEDDHA (FcII). A partir de este punto, el pH se incrementa continuamente hasta alcanzar al final del subcultivo (6 semanas) valores por encima de 6,5, correspondiendo el más bajo a los medios de cultivo que contenían 10,21 mg/L de Fe^{2+} en forma de FeEDTA (FsII). Aunque el pH de los medios de cultivo suplementados con la cantidad de hierro recomendada para el DKW-C en forma de FeEDTA (Fsl) fue ligeramente inferior que cuando se utilizó FeEDDHA, estas diferencias no parecen ser el origen del mal comportamiento de los microbrotes, al menos no la causa más importante. Van der Salm *et al.* (1997) también llegaron a una conclusión

similar, al determinar que la aparición de clorosis en explantes de *Rosa* híbrida no fue provocada por cambios en el pH del medio de cultivo independientemente de si era utilizado FeEDTA o FeEDDHA.

Estos resultados apuntan a que, efectivamente el FeEDDHA es más adecuado que el FeEDTA para la micropropagación del nogal híbrido maderero. Otros autores han llegado también a idénticas conclusiones en otras especies, por lo que sería recomendable analizar la conveniencia de descartar la utilización del FeEDTA en el cultivo *in vitro* del género *Juglans*, al menos bajo las condiciones aquí descritas.

4.1.3.2.7 Efecto de diferentes fuentes de carbono utilizadas durante la expresión radical sobre la rizogénesis y la supervivencia de las vitroplantas.

Un vez que el enraizamiento es una de las fases más críticas dentro de la micropropagación del nogal, se planteaba como imprescindible establecer las condiciones mínimas adecuadas para favorecer la rizogénesis del nogal híbrido maderero, perteneciente a un género tan recalcitrante como lo es el *Juglans*. Desde que McGranahan *et al.* (1987) recomendaran realizar el enraizamiento *in vitro* del nogal en dos etapas bien diferenciadas (pre-inducción y expresión radical), éste ha sido el método más utilizado, a pesar de que hacerlo de esta manera constituye un inconveniente para la producción comercial. Sin embargo los esfuerzos en lograr el enraizamiento *ex vitro* en un solo paso (Leslie *et al.* 2006), mucho más conveniente, ha sido de escaso aprovechamiento hasta la fecha.

Desde la publicación de la formulación DKW para el nogal por Driver y Kuniyuki (1984), importantes avances se han realizado sobre el enraizamiento. Pero sin dudas el más relevante fue utilizar una mezcla de vermiculita y medio de cultivo gelificado con agar durante la expresión radical (Jay-Allemand *et al.* 1992).

Tradicionalmente, la sacarosa ha sido empleada como fuente de carbono para favorecer la formación de las raíces en el nogal. La rizogénesis es un proceso dependiente de la energía disponible en el microbrote. Al éste tener una capacidad fotosintética limitada, claramente las reservas de energía en forma de hidratos de carbono tienen que provenir necesariamente de las aportaciones realizadas en el medio de cultivo antes y durante la formación de las raíces. Poco se ha investigado en el género *Juglans* sobre éste aspecto, al que sin embargo, Chenevard *et al.* (1995) le dedicaron una gran atención. Estos autores probaron el efecto de varias dosis de sacarosa durante la formación *in vitro* de las raíces de un híbrido de nogal, concluyendo que la utilización de una fuente de carbono es decisiva durante esta fase, al lograr un incremento en el porcentaje de enraizamiento, el número de raíces formadas y el contenido de materia seca respecto

al control sin sacarosa. También comprobaron que el contenido de carbohidratos solubles (sacarosa, glucosa y fructosa) era elevado en las raíces no siendo así en el tallo y en las hojas, lo que podría ser una indicación de que éstos son utilizados en la rizogénesis; corroborándose el planteamiento original sobre la importancia de encontrar una fuente de carbono adecuada para el enraizamiento del nogal híbrido maderero.

Tabla 19 Efecto de tres fuentes de carbono alternativas sobre el enraizamiento de los microbrotes y la supervivencia de las vitroplantas

Genotipo	Fuente de Carbono	Enraizam. (%)	Raíces/ Microbrote	Longitud de la Raíz (mm)	Longitud de los Microbrotes (mm)	Superviv. (%)
DA	Fru	89,5 ± 7,8 ^a	4,5 ± 0,3 ^a	25,9 ± 12,2 ^a	43,1 ± 8,9 ^a	33,7 ± 8,9 ^a
	Glu	80,4 ± 10,0 ^a	4,8 ± 1,1 ^a	35,6 ± 18,5 ^b	45,3 ± 10,0 ^a	66,7 ± 10,2 ^c
	Suc	76,7 ± 20,8 ^a	4,4 ± 0,4 ^a	33,7 ± 18,7 ^b	42,7 ± 9,5 ^a	47,1 ± 10,4 ^b
DE	Fru	78,7 ± 5,2 ^a	3,0 ± 1,5 ^a	17,8 ± 7,6 ^a	25,4 ± 3,9 ^a	32,1 ± 8,5 ^a
	Glu	68,2 ± 4,9 ^a	2,1 ± 0,6 ^a	26,4 ± 5,1 ^b	29,1 ± 4,5 ^a	57,0 ± 7,4 ^b
	Suc	67,3 ± 5,1 ^a	2,2 ± 1,0 ^a	27,9 ± 6,5 ^b	28,7 ± 6,8 ^a	56,8 ± 9,1 ^b
DM	Fru	95,0 ± 7,1 ^c	6,1 ± 1,3 ^b	27,0 ± 7,4 ^a	21,1 ± 4,3 ^a	49,6 ± 8,1 ^a
	Glu	68,9 ± 8,9 ^a	3,1 ± 1,0 ^a	28,2 ± 8,8 ^a	28,6 ± 4,9 ^b	81,0 ± 7,4 ^b
	Suc	78,1 ± 7,1 ^b	3,5 ± 2,0 ^a	29,9 ± 12,7 ^a	29,4 ± 6,4 ^b	74,6 ± 6,2 ^b
DN	Fru	63,3 ± 3,2 ^a	5,0 ± 1,4 ^b	30,9 ± 4,6 ^a	24,2 ± 3,3 ^a	65,4 ± 5,5 ^b
	Glu	61,4 ± 3,9 ^a	3,1 ± 1,0 ^a	29,9 ± 4,1 ^a	26,5 ± 1,9 ^b	51,0 ± 4,3 ^{ab}
	Suc	48,5 ± 4,3 ^a	2,6 ± 1,0 ^a	29,2 ± 6,2 ^a	26,4 ± 2,4 ^b	46,2 ± 5,1 ^a
D15	Fru	91,8 ± 5,2 ^a	4,2 ± 0,9 ^a	20,5 ± 4,5 ^a	32,6 ± 3,9 ^a	75,7 ± 3,3 ^a
	Glu	90,1 ± 6,1 ^a	3,6 ± 0,5 ^a	24,4 ± 2,8 ^a	32,6 ± 5,5 ^a	83,3 ± 2,7 ^a
	Suc	95,2 ± 6,1 ^a	3,3 ± 0,8 ^a	24,7 ± 5,1 ^a	35,9 ± 4,0 ^a	76,3 ± 2,2 ^a
D48	Fru	89,5 ± 9,3 ^b	3,6 ± 1,3 ^b	33,3 ± 4,6 ^b	24,0 ± 3,4 ^a	62,1 ± 6,9 ^a
	Glu	67,1 ± 8,2 ^a	2,5 ± 0,8 ^a	27,8 ± 6,0 ^a	25,4 ± 2,8 ^a	65,3 ± 4,4 ^a
	Suc	65,2 ± 6,6 ^a	2,2 ± 1,2 ^a	25,8 ± 2,7 ^a	24,8 ± 2,1 ^a	55,6 ± 5,5 ^a
D51	Fru	79,3 ± 9,3 ^b	3,7 ± 1,6 ^b	28,1 ± 5,4 ^a	24,0 ± 3,4 ^a	43,6 ± 4,3 ^a
	Glu	64,6 ± 7,2 ^{ab}	2,4 ± 0,4 ^a	34,9 ± 6,7 ^b	25,4 ± 2,8 ^a	49,2 ± 7,4 ^a
	Suc	55,6 ± 6,6 ^a	2,5 ± 0,9 ^a	29,2 ± 8,1 ^a	24,8 ± 2,1 ^a	51,5 ± 6,5 ^a
D53	Fru	78,6 ± 8,7 ^a	4,0 ± 0,8 ^b	20,7 ± 4,2 ^a	28,9 ± 3,0 ^a	28,3 ± 1,5 ^a
	Glu	77,8 ± 4,8 ^a	3,0 ± 0,6 ^a	21,5 ± 4,2 ^a	30,0 ± 4,3 ^{ab}	32,7 ± 1,1 ^a
	Suc	82,6 ± 7,6 ^a	3,4 ± 0,7 ^{ab}	19,6 ± 3,7 ^a	32,3 ± 1,7 ^b	26,5 ± 2,7 ^a
D117	Fru	73,5 ± 6,6 ^b	3,4 ± 1,4 ^a	25,5 ± 5,7 ^a	28,9 ± 3,9 ^a	56,8 ± 5,6 ^a
	Glu	64,3 ± 10,5 ^{ab}	3,1 ± 1,4 ^a	28,5 ± 8,3 ^a	32,6 ± 5,5 ^b	74,1 ± 5,9 ^b
	Suc	49,5 ± 7,6 ^a	2,7 ± 1,5 ^a	28,5 ± 10,2 ^a	35,9 ± 4,0 ^b	68,8 ± 4,3 ^{ab}

Los valores representan la media ± la desviación estándar. La significación estadística se expresa con superíndices. Sólo los valores con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$, prueba de LSD). El enraizamiento se evaluó después de 3 semanas. Se utilizó como fuente de hierro FeEDDHA (6,81 mg / L de Fe3 +). En la fase previa a la pre-inducción radical el medio de cultivo se suplementó con PG (0,2 mM). En la fase de pre-inducción radical se utilizó como fuente de carbono sacarosa (117,0 mM). Todos los azúcares se añadieron al medio de enraizamiento a una concentración final de 83,2 mM. Fru (fructosa), Glu (glucosa), Suc (sacarosa). La supervivencia se evaluó luego de 6 semanas de iniciada la aclimatación

Los azúcares no solo actúan como fuente de energía sino que además determinan en gran medida la respuesta morfogénica (George 1993), estando involucrados en procesos diferentes y en ocasiones antagónicos (Borisjuk *et al.* 1998, Weber *et al.* 1998, da Rocha *et al.* 2005, Gibson 2005). Por estas razones y a falta de referencias en el nogal se decidió investigar el efecto de la sacarosa, la glucosa y la fructosa sobre el enraizamiento y la supervivencia del nogal híbrido maderero.

En general, el enraizamiento *in vitro* de los microbrotes de nogal híbrido maderero estuvo determinado por el genotipo más que por la fuente de carbono utilizada, aunque ésta tuvo un papel importante en su modulación (**Tabla 19**). El clon D15 obtuvo el porcentaje más alto de formación de raíces (95,2% con sacarosa), mientras que el DM fue el que alcanzó el mayor número raíces por microbrote (6,1 con fructosa); por su parte el DA fue el clon con los microtallos más altos, independientemente de la fuente de carbono utilizada, así como poseía las raíces más largas (35,6 mm con glucosa). También para el manzano (Pawlicki y Welander 1995), alcornoque (Romano *et al.* 1995), *Arabidopsis thaliana* (Takahashi *et al.* 2003), *Ceratonía siliqua* (Custódio *et al.* 2004) y dos especies de eucalipto (da Rocha *et al.* 2005) han sido reportadas respuestas diferenciales en el enraizamiento y sus componentes con el uso de diferentes azúcares y concentraciones.

Los intentos de asociar la supervivencia con algunas de las variables evaluadas fueron infructuosos. Los brotes más altos se registraron para el clon DA, sin embargo su mortalidad se situó en la parte media de valores para ésta variable. La menor mortalidad se produce en el D15 con 83,3% de supervivencia en presencia de glucosa, sin embargo para éste la cantidad de raíces formadas (3,6) es casi la mitad de las que alcanza el DM (6,1) con fructosa, tratamiento con el que éste último clon registra uno de los valores más bajos de supervivencia (49,6%). Chenevard *et al.* (1995) señalaron que el mejoramiento de la supervivencia está relacionado con ciertas características morfológicas como el número de raíces y hojas en el momento del trasplante aunque encontraron bajos coeficientes de correlación ($r \leq 0,21$) en los dos genotipos de nogal híbrido utilizados; evidenciándose que es difícil hacer predicciones sencillas sobre la mortalidad. Quizás un modelo más complejo, en el que intervengan no solo variables morfológicas sino también bioquímicas y fisiológicas, podría ser aprovechable. No obstante a ello, un hecho interesante, que apoya la hipótesis anterior, se produjo al comprobar que la supervivencia era menor entre la población de microbrotes con 1 ó 2 raíces, que dentro de la que tenía más de dos raíces, aunque algunos genotipos fueron más afectados que otros. Chenevard *et al.* (1995) también coinciden en que la supervivencia de 2 clones de nogal híbrido estuvo relacionada con la cantidad de raíces formadas por microbrote, al encontrar que el 94% de ellos con más de 4 raíces sobrevivieron, mientras que ese porcentaje se redujo a 63% para aquellos que tenían menos de 2.

Estos resultados han permitido extraer sin embargo algunas conclusiones generales. **El éxito del enraizamiento depende, además del genotipo, del tipo de fuente de carbono utilizada durante la formación de las raíces.** El porcentaje de enraizamiento

fue superior cuando el sustrato empleado fue la fructosa, exceptuando los clones D15 y D53 para los que la sacarosa coincide en ser mejor que los otros dos. **Por su parte, la supervivencia estuvo también asociada con el tipo de azúcar utilizado.** Si bien, el número de raíces es favorecido rotundamente por la utilización de la fructosa, parece ser claro que la supervivencia mejora con el empleo de glucosa en el medio de expresión radical, excepto para los genotipos DN y D51, en los que la fructosa y la sacarosa, respectivamente, fueron ligeramente superiores.

Una vez más quedó evidenciado el determinismo del factor genético. Algunos clones, como el DA, el DE, el DM y el D117 fueron muy sensibles al cambio de la fuente de carbono; mientras que otros, como el D15 y el D53, reaccionaron muy poco al uso de un tipo de azúcar u otro.

Desde el punto de vista del desarrollo de un protocolo de propagación comercial de nogal híbrido maderero, se consideró oportuno utilizar, de momento, la glucosa (83,2 mM) como fuente de carbono durante la subfase de expresión radical. Independientemente de que la sacarosa es un sustrato menos costoso que la glucosa, pudiendo redundar en la reducción del coste de la vitroplanta, las ventajas que ofrece ésta última en el mejoramiento de la supervivencia son evidentes. No obstante es necesario continuar profundizando en este aspecto pues esta ha constituido una primera aproximación, con la atención puesta en la disminución de la mortalidad a través del mejoramiento de la rizogénesis.

En el momento del trasplante se apreciaron diferencias morfológicas en el sistema radical, dependiendo de la clase de fuente de carbono utilizada. En presencia de fructosa, los microbrotes formaron raíces con un ángulo más agudo respecto al tallo; mientras que los que se cultivaron con sacarosa o glucosa tendieron a formar raíces en un plano más horizontal. También se observó que las raíces formadas con fructosa son más delgadas y más oscuras que cuando se utiliza sacarosa o glucosa; lo que podría ser una indicación de que la fructosa podría ser asimilada más rápido que los otros azúcares y/o intervenir como una señal precoz para la rizogénesis, lo que motivaba que las raíces fueran aparentemente más viejas. Al respecto McGranahan *et al.* (1987) señalan que en el nogal Paradox a medida las raíces envejecen, cambian de color blanco a marrón. En cualquier caso la fructosa parece ser más adecuada para la iniciación radical del nogal híbrido maderero que la sacarosa y la glucosa. En *Ceratonía siliqua* Custódio *et al.* (2004) arribaron a conclusiones similares respecto al momento de la emergencia de las raíces, al encontrar diferencias de acuerdo al tipo de fuente de carbono utilizada. Estos resultados concuerdan con un análisis posterior hecho a vitroplantas en la 7^{ma} semana de la aclimatación, en el que se comprobó que la

formación de raíces *de novo* en los microbrotes provenientes del medio de cultivo con fructosa era mucho menor que con los otros dos azúcares (**Fig. 21**).

Fig. 21 Vitroplantas de nogal híbrido maderero 7 semanas después de iniciada la aclimatación. Microbrotes provenientes de medios de cultivo suplementados con (a) sacarosa, (b) fructosa y (c) glucosa durante la formación de las raíces. Con flechas señaladas raíces principales formadas de novo

Tabla 20 Crecimiento de las vitroplantas después de 7 semanas del inicio de la aclimatación

Gen.	Fuente Carbono	Raíces/ Microbrote			Longitud de la Raíz (mm)*			Longitud de la Vitroplanta (mm)		
		0 semana	7 ^{ma} semana	Increment.	0 semana	7 ^{ma} semana	Increment. (mm)	0 semana	7 ^{ma} semana	Increment. (mm)
D15	Fruc	5,3	6,1	0,9	22,4	99,6	77,1	34,1	38,6	4,4
	Gluc	4,0	4,9	0,9	24,4	106,0	81,6	40,1	46,0	5,9
	Suc	4,1	6,0	1,9	31,7	113,7	82,0	34,4	39,7	5,3
D48	Fruc	4,9	5,4	0,6	35,4	106,7	71,3	26,7	28,4	1,7
	Gluc	2,1	6,1	4,0	31,7	121,0	89,3	28,7	31,3	2,6
	Suc	2,4	5,6	3,1	31,1	120,4	89,3	26,4	31,0	4,6
D117	Fruc	3,4	4,0	0,6	31,6	125,6	94,0	30,4	42,9	12,4
	Glu	3,6	6,3	2,7	35,0	134,3	99,3	31,0	59,1	28,1
	Suc	2,4	5,7	3,3	26,0	132,0	106,0	30,6	49,0	18,4

* longitud de la raíz más larga. Fruc, fructosa. Glu, glucosa. Suc, sacarosa

Siete semanas después del inicio de la aclimatación, las diferencias entre las 3 fuentes de carbono siguen siendo importantes (**Tabla 20**), aunque éstas siguieron básicamente un patrón genético. Resultados similares encontraron Bonal y Monteuiis (1997) en teca, afirmando que el estado del enraizamiento *in vitro* de los microtallos antes de aclimatación influyó en el comportamiento de las vitroplantas después de 7 semanas de iniciada. En el caso del nogal híbrido maderero, los microbrotes provenientes de los

medios de cultivo con sacarosa y glucosa fueron más altos, con mayor número de raíces recién formadas y de mayor longitud que los cultivados con fructosa.

Durante el primer mes y medio el brote prácticamente detiene su crecimiento, favoreciéndose el desarrollo del sistema radical. Mientras que los incrementos de altura son bastante escasos, el número de raíces puede incrementarse hasta casi 3 veces, como es el caso del clon D48 en presencia de glucosa y la longitud de las raíces puede llegar a quintuplicarse, como en el caso del genotipo D117 cultivado con sacarosa. Un dato importante es que las raíces que se formaron *in vitro* tuvieron la capacidad de generar otras secundarias así como pelos radicales (**Fig. 21**), sugiriendo que este sistema radical es, como mínimo, potencialmente funcional, teniendo entonces la capacidad de sostener el crecimiento de la vitroplanta, al menos, en el inicio de la aclimatación. La certeza de este postulado despejaría las dudas acerca de la existencia de una conexión vascular entre el tallo y las raíces.

4.1.3.2.8 Análisis de los sistemas radicales y foliares formados in vitro

Necesariamente el protocolo aquí propuesto implica el trasplante a condiciones *ex vitro* de los microbrotes enraizados *in vitro*. Desde el punto de vista del desarrollo de una tecnología comercial esto constituye un inconveniente, sin embargo el trasplante directo de plantas sin enraizar, aunque podría garantizar porcentajes elevados de supervivencia, el número de vástagos con raíces es muy bajo (Leslie *et al.* 2006). Los resultados de intentar enraizar el nogal híbrido maderero en condiciones *ex vitro* son muy pobres, no sobrepasando en el mejor de los casos el 10% de microbrotes con raíces (datos no mostrados).

Otro gran problema que hay que resolver en la micropropagación de las especies del género *Juglans* es la existencia de pérdidas importantes durante la aclimatación. La supervivencia tiene una componente genética bastante elevada, como ha sido analizado en los capítulos precedentes. Los resultados aquí presentados concuerdan con los de otros autores, como Navatel y Bourrain (2001) y Dolcet-Sanjuan *et al.* (2004), quienes afirman para el nogal el porcentaje de plantas aclimatadas es genotipo-dependiente. Leslie *et al.* (2006), por su parte, han reportado supervivencias para el nogal Paradox que oscilan entre el 22 y el 90%, promediando 65% para todos los clones evaluados.

Las plantas producidas *in vitro* suelen tener problemas para soportar las condiciones *ex vitro*, presumiblemente porque no son capaces de mantener un equilibrio interno adecuado de agua (Smith *et al.* 1991). El origen del desequilibrio entre la pérdida y la absorción de agua está en la presencia de sistemas estomáticos atrofiados, así como en la formación de raíces sin conexión vascular con el vástago y/o sin pelos radicales

(George 1996). Al respecto, Driver y Kuniyuki (1984) señalan que, independientemente que el 80% de los microbrotes de nogal Paradox sometidos a un tratamiento con ANA formaron raíces, ninguno sobrepasó la fase de aclimatación pues faltaba la conexión vascular entre éstas y el tallo. En el caso del nogal híbrido maderero, con su manifiesta recalcitrancia, la mortalidad suele ser un inconveniente para la propagación comercial de la mayoría de los genotipos. En la búsqueda de posibles explicaciones, que conduzcan a mejorar la supervivencia durante la aclimatación, era de vital importancia determinar si defectos en la morfología tanto de los sistemas radicales y estomáticos podrían ser el origen de las pérdidas en la fase *ex vitro*. Con tal propósito se procedió a realizar un análisis de la morfología tanto de las raíces como de los estomas formados *in vitro*.

Al final de la pre-inducción radical la parte del tallo de la mayoría de los microbrotes en contacto con el medio de cultivo se había hinchado, mostrando una superficie lisa pero irregular, de color verde amarillento, con la presencia de protuberancias blanquecinas, en ocasiones (**Fig. 22b**). Aunque en algunos casos se puede determinar tácitamente que las raíces se originan directamente del tallo, lo más común es ver “surgir” éstas de una masa callosa (**Fig. 22d**), pudiendo ser indicativo de una independencia tisular entre la raíz y el tallo. Este sería el peor de los escenarios pues implicaría que las vitroráíces no serían funcionales, obligando a que el proceso de rizogénesis tuviera que ser reiniciado durante la aclimatación, algo poco probable que sucediera teniendo en cuenta los resultados de otros autores (Pijut y Moore 2002, Leslie *et al.* 2006) y de la experiencia previa con el híbrido maderero.

Sin embargo, se pudo comprobar que las raíces formadas *in vitro* tienen su origen en el tejido cambial del tallo (**Fig. 22e**). La continuidad raíz-tallo existente descarta la presencia de algún otro tipo de tejido (callo) entre éstos, lo que garantiza, en principio, una perfecta conexión vascular. Es posible que algunas de las vitroráíces formadas no estén asociadas directamente con el tallo, pudiendo ser el origen de la muerte de algunos vástagos con 1 ó 2 raíces, sin embargo en las muestras analizadas no se detectó éste tipo de anomalía. Todo parece indicar que, para las condiciones aquí descritas, la rizogénesis se produce de manera independiente a la callogénesis.

Un análisis más detallado permitió comprobar no solo la existencia de una continuidad entre el tallo y las raíces sino también la conexión entre ambos órganos por el tejido vascular (**Fig. 22f**). Los análisis histológicos demuestran además que los elementos xilemáticos están bien estructurados, con la presencia de las típicas perforaciones que permitirían la comunicación con los elementos adyacentes (**Fig. 22g**) y, por tanto, el flujo de savia hacia la parte superior de la vitroplanta.

Fig. 22 Detalles del proceso de enraizamiento (a-c) y del sistema radical de una vitroplanta de nogal híbrido maderero en la 3^a semana del inicio de la subfase de expresión radical (d-g). (a) Microbrotes al término de la 6^{ta} del subcultivo, antes del inicio de la pre-inducción radical. (b) Parte basal del microbrote al final de la pre-inducción. (c) Microbrote enraizado. (d) Parte basal del tallo, donde se observa la proliferación de una masa callosa alrededor de raíces con la presencia de abundantes pelos radicales. (e) Corte transversal de la base de un tallo portando una raíz lateral (1X). (f) Corte transversal de la base del tallo (5X) mostrando el flujo de las bandas xilémáticas desde éste hacia la raíz recién formada. (g) Elementos traqueales mostrando una disposición y estructuras adecuadas. BX, bandas xilémáticas. CB, callo basal. M, médula. RL, raíz lateral. T, tallo

El hecho de que el sistema radical formado *in vitro* posea todas éstas características, sugiere que éste es potencialmente funcional y que no se dispone de ningún elemento que induzca a atribuir la mortalidad a anomalías asociadas a él, al menos hasta donde se ha podido comprobar. La perdurabilidad de las vitroráices en el tiempo, la existencia de conexión vascular de éstas con el tallo y la presencia de elementos vasculares bien estructurales son un indicador de que

las condiciones bajo las que se conduce las fases de pre-inducción y de expresión radical son, como mínimo, favorables.

Descartadas la presencia de anomalías en el sistema radical formado *in vitro*, quedaría por determinar entonces si la causa principal de las muertes serían malformaciones en el aparato estomático.

Como se analizó anteriormente, durante las primeras 7 semanas de iniciado el endurecimiento, el brote prácticamente detiene su crecimiento favoreciéndose el desarrollo del sistema radical (**Tabla 20**). Mientras que los incrementos en altura son bastante escasos, el número y la longitud de las raíces aumentaron considerablemente. Al inicio de la aclimatación el crecimiento de la parte superior del microbrote se ralentiza, sin observarse el despliegue de hojas nuevas durante las 3 primeras semanas (datos no mostrados). Es durante la 4^{ta} semana que comienza la emisión de nuevas hojas en las vitroplantas sobrevivientes. Esto sugiere que, al no existir aportaciones externas de azúcares, las hojas formadas *in vitro* son necesariamente las encargadas de suministrar la energía necesaria para el desarrollo de toda la vitroplanta. Como dato adicional, se pudo comprobar que estas hojas permanecen unidas a las plantas varias semanas después del trasplante. Siendo así, el sistema estomático de éstas debería de ser capaz de activarse y ser autosuficiente para mantener el equilibrio hídrico de la vitroplanta. Esta tesis sería válida sólo en caso de que las células estomáticas no posean, en principio, ningún tipo de distrofia.

A partir de las observaciones realizadas se comprobó la inexistencia de malformaciones en el sistema estomático formado *in vitro*, indicando que éste posee, como mínimo, la capacidad de recuperar su funcionalidad. Cuando se comparó la estructura de los estomas formados *in vitro* (**Fig. 23a**) con los de plantas *ex vitro* (**Fig. 23c**) y de árboles adultos (**Fig. 23e**) fue difícil determinar *a prima* vista cuáles provenían de una condición u otra. Sin embargo, un análisis pormenorizado permitió establecer algunas diferencias. Por ejemplo, el número de estomas de las hojas formadas *in vitro* es superior al de las plantas adultas y éstas al de las formadas *ex vitro*. Pizaña (2004), en *Physalis peruviana*, y Capellades *et al.* (1990), en *Rosa multiflora*, también encontraron la presencia de una densidad estomática superior en microbrotes respecto a las plantas en invernadero.

Un detalle morfológico llamativo fue la presencia en todos los tipos de hojas de estomas de gran tamaño rodeados de otros más pequeños y numerosos. Igualmente se pudo observar que en el momento de tomar las muestras, los estomas de las hojas de microbrotes en multiplicación poseían una forma redondeada, pero sin estar completamente abiertos, contrastando con la forma más elíptica de los provenientes de

plantas autosuficientes. Quizás esto sea indicativo de una cierta activación de los aparatos estomáticos aun en condiciones *in vitro*.

Fig. 23 Microfotografías de estomas provenientes de secciones de hoja de microbrotes en proliferación durante la 5^a semana del subcultivo (a) y (e) aumentadas 20X y 50X, respectivamente, (b) estomas de hojas formadas *in vitro* de una vitroplanta aclimatada en la 7^{ma} semana del inicio de la aclimatación (20X), (c) estomas de hojas formadas *ex vitro* de una vitroplanta en la 7^{ma} semana del inicio de la aclimatación (20X), (d) y (f) estomas de hoja de árbol adulto de 11 años aumentadas 20X y 50X, respectivamente. Todas la imágenes fueron tomadas de la parte abaxial

Al no encontrarse completamente cerrados los estomas de los microbrotes (**Fig. 23a,e**), se refuerza la hipótesis de que el sistema estomático formado *in vitro* es funcional, al menos parcialmente, sugiriendo así que no son los principales causantes de las pérdidas *ex vitro*. Marín *et al.* (1998) también cuestionan que el sistema estomático sea

el principal causante de las muertes en *Prunus cerasus* durante el trasplante, una vez que éste tiene la capacidad de adaptarse a las nuevas condiciones modificando algunas características de las células guardianas en el transcurso de la aclimatación.

Algunas alteraciones morfológicas de la hojas *in vitro* (probable ausencia de una capa de cera protectora y una cutícula muy fina) unidas a deficiencias en el mecanismo de cierre de los estomas han sido señaladas por Blanke y Belcher (1989) como la causa de la rápida desecación de las plantas. Entonces, podría ser probable que, al no existir deformaciones aparentes en las células oclusivas formadas *in vitro* en el nogal híbrido maderero, su funcionamiento normal podría ser restaurado durante la aclimatación, como sucede en el manzano (Brainerd y Fuchigami 1982).

Luego de analizar tanto el sistema radical como el estomático, todo parece indicar que ni uno ni otro son los responsables directos de la muerte de las vitroplantas durante la aclimatación. Tanto las raíces como las hojas formadas *in vitro*, de acuerdo a su estructura, pueden calificarse como potencialmente funcionales. El hecho de permanecer las hojas formadas *in vitro* durante largo tiempo unidas a la vitroplanta sugiere que estos órganos son capaces de sostener el crecimiento de la vitroplanta, al menos durante las primeras semanas de la fase *ex vitro*.

4.1.3.2.9 Resultados del protocolo de micropropagación

El primer resultado obvio es que con este protocolo se ha desarrollado la capacidad de clonar algunas de las selecciones del nogal híbrido maderero establecidas *in vitro*, 16 en total. Este constituye en sí mismo un hecho relevante, pues pocos laboratorios a nivel internacional poseen la capacidad de clonar con un mismo protocolo varios genotipos de nogal. En este sentido la mayor parte de los esfuerzos han sido dedicados a la micropropagación de nogales para fruta y portainjertos, en principio un mercado menos complejo que el de la madera. Es muy probable que estas metodologías podrían adaptarse para reproducir nogales para madera pero ya sea por falta de genotipos seleccionados para tal fin, por temas de confidencialidad, por la incapacidad de cerrar el ciclo de micropropagación de las selecciones para madera o por la combinación de ellas, el caso es que no existe ningún reporte al respecto.

Los primeros ensayos destinados a conseguir el enraizamiento de al menos un genotipo de nogal híbrido maderero tuvieron lugar en el 2009. Un año más tarde fueron enraizados los primeros 4 clones, a partir de los cuales se produjeron 104 vitroplantas (**Fig. 24a**). A pesar de que, tanto los porcentajes de plantas con raíces (15,9) como la supervivencia (7,4) fueron extremadamente bajos, era la primera vez que se lograba

clonar algunos genotipos selectos de nogal híbrido maderero, lo que sirvió como punto de partida para poder mejorar el protocolo de micropropagación existente.

En 2011, se centró toda la atención en mejorar el enraizamiento de los mismos 4 genotipos, lográndose casi duplicar (27,4%) el porcentaje de microbrotes con raíces, respecto a 2010. Desde hacía 4 años se había introducido y generalizado el uso del FeEDDHA y el PG, además de se habían establecido las bases para producir microbrotes de calidad, por lo que estos resultados estuvieron determinados principalmente por los ensayos realizados con diferentes concentraciones de sacarosa durante la pre-inducción radical. Aunque con estos cambios se mejoró el enraizamiento y se produjeron 475 vitroplantas, la mortalidad seguía siendo muy alta: casi del 90,0%.

El 2012 supuso no solo un cambio cuantitativo, sino también cualitativo, en la producción. Si bien solo se produjeron 66 plantas más que en 2011, se mejoró considerablemente el enraizamiento y la supervivencia, alcanzándose 59,9% y 23,9%, respectivamente. Significativo fue además el tener la posibilidad de reproducir 8 de los genotipos establecidos *in vitro*. Durante este mismo año se comenzó a evaluar el uso de diferentes fuentes de carbono durante la expresión radical, lo que junto con las modificaciones antes mencionadas contribuyeron a mejorar la producción de plantas en 2013, llegándose a obtener casi el 61,0% de supervivencia y superándose por vez primera la cifra de 1600 vitroplantas pertenecientes a 9 clones. Estos resultados no solo fueron la consecuencia lógica del mejoramiento del protocolo *in vitro*, sino también de un mejor control y el establecimiento de condiciones más adecuadas durante la fase *ex vitro* (humedad relativa y del sustrato, temperatura ambiente, iluminación y tipo de sustrato, entre los factores más significativos).

Corregir el uso del PG en la fase previa a la pre-inducción durante 2014, fue la probable causa de superar las 3400 vitroplantas aclimatadas de 14 genotipos en una sola campaña. El incremento del número de clones, sin duda redundó en una ligera reducción de la supervivencia respecto al año anterior (**Fig. 24c**). A cambio se alcanzó el más alto porcentaje de enraizamiento logrado hasta la fecha, con un 63,8% global.

Como dato significativo se debe señalar que, una vez definido el actual protocolo, se quiso probar su eficacia intentando producir por primera vez planta de algunos genotipos como el DL, D213 y D214; así como de otros como el D16 y el D63, que habían demostrado ser altamente recalcitrantes al enraizamiento. **Como resultado relevante, se puede señalar que fue posible enraizar y obtener planta de los 5 clones antes mencionados realizando un único intento. Sin duda alguna este ha constituido un**

hecho que marca un paso importante hacia el establecimiento de un protocolo de producción comercial de nogal.

Fig. 24 Resultados globales de la producción de nogal clonal en el período 2010-2014. El dato que mejor refleja la evolución del protocolo de micropropagación del nogal híbrido maderero, además de la antes mencionada capacidad para establecer exitosamente *in vitro* determinados árboles, es la eficiencia con que se ejecutan las

fases 3 (enraizamiento) y 4 (aclimatación). Si se multiplica el porcentaje de enraizamiento por el de supervivencia obtendremos una valoración bastante precisa de todo el proceso, una vez que la proliferación no entraña *a priori* ninguna dificultad y que el objetivo final de la micropropagación es producir vitroplantas para su retorno al campo. Antes del 2010, como es lógico, la eficiencia fue de 0 pues a pesar de lograr el enraizamiento del clon DA, ninguna planta sobrepasó la fase *ex vitro*. A partir de este año la eficiencia se fue incrementando hasta alcanzar valores globales por encima del 30,0% en 2013 y 2014, lo que significa que por cada 1000 microbrotes que iniciaron la fase de enraizamiento *in vitro*, se plantaron en condiciones de campo algo más de 300 árboles.

Fig. 25 Resumen de las fases 3 y 4 de la metodología de micropropagación del nogal híbrido maderero. (a) Microbrotes enraizados en el momento del trasplante. (b) Vitroplantas después del trasplante en macetas de 200 cm³ de volumen. (c) Vitroplantas aclimatadas con 7 semanas de edad. (d y e) Vitroplantas con 12 semanas de trasplantada a condiciones *ex vitro*

Estos resultados podrían ser comparables a los de equipos de investigación líderes mundiales en este campo, como el del campus de Davis, de la Universidad de California

(EUA); quienes han desarrollado un protocolo de propagación por cultivo de tejidos, que durante 2006 les permitió clonar hasta 2700 plantas de 27 genotipos de un portainjerto de nogal, con porcentajes de enraizamiento y de supervivencia del 55 y del 50%, respectivamente (McGranahan *et al.* 2006); valores ligeramente inferiores a los alcanzados con el protocolo aquí descrito.

En la **Fig. 25** se expone de manera gráfica un resumen del protocolo de micropropagación. Es de destacar el vigor que manifiesta el sistema radical de las vitroplantas. Significativo es que, bajo condiciones adecuadas, en solo 7 semanas las raíces de las vitroplantas sean capaces de explorar completamente el interior de un envase de 200 cm³ de capacidad (**Fig. 25c**), siendo necesario el trasplante a una maceta de mayor volumen.

Fig. 26 Evolución del desarrollo del sistema radical del nogal híbrido maderero micropropagado de los clones D53 (a-e) y D15 (f). (a) Vitroplanta de 7 semanas después del inicio de la aclimatación. (b) Vitroplanta endurecida en 2010, en el momento del trasplante a tierra proveniente de una maceta con un volumen de 1000 cm³ (08/07/2011). (c) Planta descalzada el 09/01/2012. (d) Planta descalzada el 06/07/2012. (e) Antes del trasplante a plantación definitiva (30/01/2013). (f) Rameto luego de 1 año de ser establecido en tierra

Transcurrido tan solo 1 mes ocurre lo mismo en un envase 15 veces mayor: las raíces son capaces de colonizar todo el volumen disponible (**Fig. 25e**). Es probable que el

disponer de una amplia red de raíces, aumente la capacidad de absorción de las vitroplantas y, por tanto, se vea favorecido el crecimiento, en general. Esta sugerencia concuerda con dos hechos presentados anteriormente (capítulo 4.1.3.2.7): primero, que las vitroplantas con más de 2 raíces tienen más posibilidades de sobrevivir y, segundo, que las vitroplantas tienen la capacidad no solo de retener durante varias semanas todas las raíces formadas *in vitro*, sino que además son capaces de emitir otras nuevas (**Tabla 20**).

Chenevard *et al.* (1997), comprobaron que las vitroplantas de un híbrido de nogal (*Juglans nigra* no. 23 X *J. regia*), luego de transcurridos varios meses del inicio de la aclimatación, conservaron varias raíces principales, a diferencia de las de semilla. El protocolo aquí presentado también favorece la aparición de múltiples raíces con desarrollos similares, surgiendo directamente del tallo (**Fig. 26**), las que bien podrían contribuir por igual al sostén del crecimiento, al menos en las primeras etapas. Mason *et al.* (2013), también han señalado la presencia de sistemas radicales adventicios semejantes a los pivotantes en microesquejes de *Hevea brasiliensis*, los que manifiestan mejores características productivas que los injertados. Se desconoce si el hecho de poseer un sistema radical vigoroso y ramificado puede ser la causa principal de los crecimientos registrados pero es evidente que bien podría constituir una ventaja, incluso competitiva.

Además de la calidad genética por la que fueron seleccionados los ortetos, el estado clonal podría ser una consecuencia del vigor mostrado. Los beneficios obtenidos de la utilización de material clonal micropropagado se manifiestan no solo en el mejoramiento de los rendimientos de los cultivos sino también en los crecimientos de muchos de ellos. Este fenómeno ha sido observado en especies tan diversas como albaricoque (Pérez-Tornero *et al.* 2006), banano (Teixeira y Antonio 2011), *Zingiber officinale* Rosc. (Gupta y Verma 2011), *Hevea brasiliensis* (Mason *et al.* 2013), *Tectona grandis* L. (Goh *et al.* 2013), *Vaccinium corymbosum* L. (Martino *et al.* 2014), entre otras. También en nogal Persa para fruta, Hasey *et al.* (2005), encontraron que las plantas autoenraizadas independientemente del genotipo, tuvieron un mayor incremento en la circunferencia del tronco respecto a las injertadas. En los casos de la obtención de material saneado por cultivo de tejidos, son comprensibles los resultados alcanzados. El hecho de que esta técnica facilite el rejuvenecimiento de materiales envejecidos no explica por sí solo que las vitroplantas sean capaces de sostener, en algunos casos, crecimientos superiores al de otras fuentes de propagación, al menos no en el caso del nogal híbrido maderero, una vez que se trabajó con árboles probablemente en estado pre-adulto. Como fue señalado anteriormente, la presencia de un sistema radical ramificado, y no el mero

hecho de provenir del cultivo de tejidos, podría ser el origen del mayor crecimiento de las plantas micropropagados. Un resultado que apoya esta hipótesis fue presentado por Celestino *et al.* (2009) en alcornoque, quienes comprobaron que las plantas provenientes de embriones somáticos obtenidas a partir de material juvenil alcanzaron en las primeras etapas de crecimiento menos diámetro y altura que las plantas de origen cigótico. En cualquier caso, estudios adicionales son necesarios para el esclarecimiento de tan importante evento.

Impactante resulta también comprobar que las vitroplantas, una vez establecidas en condiciones de campo, sean capaces de incrementar más de 25 veces su altura en solo 1 año (**Fig. 28**). López (1999) ya había puesto de manifiesto para las condiciones de España el gran vigor mostrado por progenies clonales de nogal. Por su parte, Bono y Aletà (2009), también reportan incrementos importantes en la altura de 60 cm/año en clones de nogal micropropagados.

Tabla 21 Características de los ensayos clonales del nogal híbrido maderero

	Localización de los ensayos		
	La Mota (Galicia)	El Soto (Toledo)	Granada (Granada)
Coordenadas	43° 00' 00'' N	39° 54' 05'' N	37° 10' 19'' N
	08° 08' 00'' O	04° 17' 54'' O	03° 38' 18'' O
Altitud (msnm)	450	497	630
Temperatura Media Anual (°C)	12,6	15,8	15,7
Precipitación Total Anual (mm)	1898	339	352
Horas de Sol Media Mensual	1911	2992	2881
Humedad Relativa (%)	78	59	57
Textura del Suelo	Franco-arenoso	Franco arcilloso arenoso	Franco arenoso limo arcilloso
Número de Genotipos	10*	9*	8
Genotipos	DA, DE, DM, DN, D15, D48, D51, D53, D117, PS	DA, DE, DN, D15 D48, D51, D53, D117, PS	DA, DE, D48, DN, D15, D48, D51, D117
Replicas	9	6	6
Parcelas	126	54	48
Rametos	504	216	192
Marco de Plantación (m)	3 x 3	3 x 3	3 x 3
Año de Plantación	2013	2014	2014

* Incluye también progenies de semilla del híbrido Mj209xRa. PS, progenies de semilla

Como las primeras plantaciones producidas con la metodología antes descrita fueron establecidas a partir del 2013 no es posible ofrecer todavía datos numéricos sobre su comportamiento, sin embargo se puede afirmar que todos los clones han mostrado un excelente vigor y en general responden a las expectativas de un más que probable

mejoramiento de la producción de madera a partir de las nuevas selecciones del nogal híbrido maderero.

El haber desarrollado la capacidad para replicar algunas selecciones de árboles plus, junto con el perfeccionamiento del programa de selección, está permitiendo consolidar y refinar el proceso de mejora para madera. Una vez que se disponía de una reserva de árboles con características superiores, que se podían clonar por micropropagación, el siguiente paso era dar inicio a los ensayos clonales. El propósito de los mismos era,

1. confirmar el mantenimiento de las características del progenitor en su descendencia clonal,
2. determinar el comportamiento de los clones en plantación,
3. profundizar en el conocimiento de su manejo,
4. y, probablemente lo más importante, dar inicio a los estudios de interacción genotipo – ambiente.

Siendo así, en Mayo del 2013 se plantó la primera serie de 3 ensayos clonales en La Mota (Arzúa, Galicia). Los otros 2 fueron establecidos el siguiente año en El Soto (Toledo) y Granada (**Tabla 21**). Con el objetivo de poder hacer una comparación estadística entre los 3 ensayos, se aplicó el mismo diseño experimental, utilizándose el mismo marco de plantación, los mismos clones (existen ligeras diferencias que se tendrán en cuenta en el momento de los análisis y que se referirán más adelante) y, en la medida de lo posible, el mismo manejo.

Como en el momento del montaje de los ensayos se desconocían muchos elementos sobre el mejor manejo que se debía ofrecer al material, se tuvo que afrontar la pérdida de muchas plantas en todos los ensayos. En la **Fig. 27** aparece representado un registro de la supervivencia de los diferentes clones en los 3 ensayos. Especialmente llamativos son los datos correspondientes a los genotipos DE, DN, D15 y, en menor medida, el DA; con mortalidades pronunciadas en al menos alguna de las localidades. Los resultados así presentados descartarían a cualquiera de ellos y en consecuencia al protocolo de micropropagación para su uso comercial. Pero se ha considerado que las bajas supervivencias no están relacionadas ni con el genotipo ni con el método de propagación utilizado, sino con el manejo aplicado a las vitroplantas antes de la plantación. Igualmente se debería descartar la falta de pericia del personal encargado del establecimiento de los ensayos como la probable causa de estos resultados. Un análisis más detallado permite hacer algunas consideraciones generales que apuntan en otro sentido,

- (1) los 4 clones antes mencionados poseen datos de mortalidad contrastantes en las 3 localidades,
- (2) coincidentemente los resultados de supervivencia más bajos solo se registran en una localización/clon de las 3 ensayadas,
- (3) las altas mortalidades son independientes del lugar de establecimiento.

Fig. 27 Supervivencia registrada para los diferentes clones en los 3 ensayos clonales

También existen algunos detalles adicionales que podrían apoyar esta suposición. Por ejemplo, en el ensayo de La Mota, por ser el primero y por coincidir con el inicio de la producción de plantas se utilizaron varios formatos de plantación: planta aviverada en tierra desde al año anterior a la plantación, planta en maceta de 3,5 L y planta en maceta de 0,2 L. De las variantes antes mencionadas, la primera es la que debería tener menor cantidad de marras por estar más endurecidas y por haber absorbido ya todas las pérdidas de etapas anteriores. En el siguiente escalón de éxito se ubicarían a las de 3,5 L y por último a las de la maceta más pequeña.

Esta hipótesis es cierta para el clon DA en La Mota, donde el 98% de las plantas habían sido aviveradas en tierra durante 1 año, pudiéndose asumir que las pérdidas de este clon en Toledo estuvieron motivadas por usar una planta más pequeña y menos endurecida (planta en maceta de 3,5 L). Sin embargo no ayudaría a explicar completamente por qué la brotación del D51 y el D53 es similar en las 3 localidades, aun habiéndose utilizado en La Mota mayormente plantas aviveradas en tierra para su plantación, como el DA, mientras que en el resto solo se utilizó planta proveniente de maceta de 3,5 L de capacidad.

Factores climáticos y operativos también provocaron pérdidas en el establecimiento del ensayo de La Mota. Por ejemplo, la plantación de algunos clones, como el DE, en

macetas de 0,2 L de capacidad, coincidió la ocurrencia de heladas tardías en primavera, en una ocasión, y a la rotura de la bomba de riego, en otra, lo que dio al traste con su

Fig. 28 Ensayo clonal de La Mota (Arzúa, Galicia). Fecha de establecimiento Mayo del 2013

supervivencia. Es evidente que materiales más pequeños y menos endurecidos serían más propensos a sufrir pérdidas. Al respecto, Clark y Hemery (2010) recomiendan no plantar materiales tan pequeños (<10 cm) bajo circunstancias normales, como modo de reducir la mortalidad de nogales híbridos micropropagados.

Muchas conjeturas podrían hacerse al respecto pero es claro que la potencialidad de este método de propagación está fuera de dudas, siendo necesario establecer criterios

tecnológicos precisos para el manejo de las vitroplantas antes de la plantación. No obstante, McGranahan *et al.* (2006) a pesar de haber realizado *a priori* un manejo correcto del material de plantación también han encontrado diferencias asociadas al genotipo.

Sin caer en exceso de optimismo respecto a la posibilidad real de convertir este protocolo en una tecnología comercial se debería señalar que estos resultados también pueden encontrarse cuando materiales más tradicionales, como las semillas, son utilizados para el establecimiento de plantaciones comerciales. Al respecto, Davis *et al.* (2004), además de señalar que la germinación de semillas de nogal es un trabajo arduo y complejo, reportan porcentajes de germinación que oscilan entre el 65 y el 85% dependiendo del manejo aplicado (en este caso tipo de cobertura de las semillas).

Por último apuntar que las marras han sido cubiertas por plantas de la misma edad, mantenidas en viveros en tierra; lo que garantiza que se reduzca la variabilidad (y por tanto la varianza) por esta causa en concreto. Dato importante es que para estas reposiciones, realizadas al año siguiente del establecimiento de los ensayos, no se han reportado ninguna baja hasta el momento.

No obstante a las dificultades afrontadas, una vez que éstas han sido resueltas, los ensayos muestran un buen comportamiento y desarrollo. Destacan sobremanera el vigor manifestado así como el comportamiento de todos los clones, en general. Detalle importante es también la dominancia apical mostrada por todas las selecciones en las tres localidades, a lo que ha contribuido sin dudas la inexistencia de daños por heladas o por otra causa (**Fig. 28**).

4.1.4 Discusión

Obtener beneficiosos de sistemas biológicos de forma intensiva, dirigida y planificada no se concibe sin disponer de organismos con genomas superiores, seleccionados para objetivos concretos (Khush 2001, Evenson y Gollin 2003). Especialmente crítico resulta este principio para especies de ciclos biológicos tan prolongados como los árboles.

La obtención de variedades con características bien definidas suele ser un proceso prolongado en el tiempo, cuya duración depende, en primera instancia, del ciclo vital de la especie objeto de mejora. Conocidos son los casos de la caña de azúcar (Cox *et al.* 2000) y el banano (Vuylsteke *et al.* 1997, Bakry *et al.* 2009), cultivos anuales, en los que los programas de mejoramiento suelen durar decenas de años.

Por razones lógicas y comprensibles existen más esfuerzos de mejoramiento en especies alimenticias que en las forestales. Sin embargo son destacados los avances logrados en coníferas (Campbell y Sederoff 1996, Tang *et al.* 2003, Wu *et al.* 2007),

eucalipto (Hamilton *et al.* 2008, Blackburn *et al.* 2010) y chopo (Confalonieri *et al.* 2003, Davis 2008).

En la familia *Juglandaceae* se han realizado muchas iniciativas de mejoramiento genético (Bey 1975, Jay-Allemand *et al.* 1996, Woeste 2002, Michler *et al.* 2007), pero ya sea por su complejidad biológica, por lo difícil que resulta propagar las selecciones obtenidas o por la combinación de ambas, lo cierto es que los pocos resultados hasta la fecha han estado confinados a pocos genotipos frutales y/o patrones para injerto. También la mala ejecución de los ensayos clonales ha limitado las salidas de algunos programas de mejoramiento para madera (Woeste *et al.* 2004).

El programa de mejora aquí analizado hace énfasis en la selección de genotipos para la producción de madera a partir de un híbrido interespecífico (*J. major* var. 209 x *J. regia*). La selección está dirigida a caracteres variables con el suficiente control genético como para poder practicar selección sobre ellos y obtener cierta ganancia que podría traducirse en una mejora del rendimiento de sus plantaciones.

El proceso inicial de selección incide no solo sobre parámetros dasométricos, como el diámetro y la altura, sino también sobre la forma de los árboles padres. En la actualidad la posibilidad de actuar sobre otros caracteres es limitada, precisamente por tratarse de individuos únicos, cuyo comportamiento ha estado condicionado por la influencia de un manejo previo, en ocasiones defectuoso.

Existe otra serie de caracteres, como la acumulación de duramen, tipo de ramificación, respuesta a la poda, entre otros, que poseen un control genético más sutil, con variaciones importantes en dependencia de las condiciones ambientales en las que se desarrollan y del tipo de gestión a que han estado sometidos los genotipos (densidad de plantación, empleo de especies acompañantes, tipo y época de poda, entre otros), sobre los que no se practica selección pero sí se poseen registros de sus diferentes comportamientos. Sobre este tipo de caracteres, únicamente se podrá conocer si se puede influir de manera objetiva con el establecimiento de ensayos clonales, en localidades con condiciones edafoclimáticas contrastantes.

Aunque existen una serie de factores bióticos que podrían determinar el éxito del programa de mejoramiento, no se dispone de protocolos específicos para evaluar la reacción de las selecciones ante la incidencia de éstos. Algunos autores hacen énfasis en que es imprescindible practicar selección sobre este tipo de caracteres, so pena de fracasar en la obtención ventajas productivas de los programas de mejoramiento (Michler *et al.* 2006)

Disponer de un sistema de reproducción vegetativa de los ortetos selectos es en estos momentos el complemento necesario del programa de mejora para el nogal híbrido maderero y un paso importante hacia su comercialización. Si bien las técnicas tradicionales, a pesar de ser complejas en su ejecución (Michler *et al.* 2006), podrían solventar la producción de plantas a pequeña escala, en el nogal serían inútiles cuando lo que se desea es producir de forma masiva.

La mejor alternativa entonces sería recurrir a las técnicas de cultivo de tejidos. No obstante, el aprovechamiento comercial de esta tecnología es muy limitada en el género *Juglans* debido a que, por un lado, las salidas de los programas de mejoramiento están reducidas a pocos genotipos (Woeste *et al.* 2004) y, por el otro, a que los nogales son considerados como altamente recalcitrantes al cultivo *in vitro* (Bisbis *et al.* 2003, Michler *et al.* 2006, Bosela y Michler 2008).

El protocolo de micropropagación aquí presentado ha sido diseñado sobre la base de la mayor simplicidad posible, con criterios y requisitos muy específicos y poniendo especial atención en el conjunto, no en las particularidades individuales. Para su desarrollo, se partió de los resultados disponibles en la literatura, los que se adaptaron a las condiciones particulares descritas.

Una de los primeros retos que se logró resolver fue la estabilización de los cultivos *in vitro*, consiguiendo que los resultados fueran repetibles dentro de los clones. Este paso fue imprescindible para la realización de muchos experimentos.

El destino final de todo el esfuerzo era poder enraizar y, en consecuencia, producir planta de nogal por micropropagación. Si bien algunos autores, como McGranahan *et al.* (1987), habían definido algunos criterios que debían cubrir los microbrotes para ser enraizables, pocos detalles estaban disponibles sobre cómo obtenerlos.

Luego de la realización de muchos experimentos, se pudieron establecer algunos factores claves que permitieron obtener buenos resultados sobre etapas tan críticas como el enraizamiento y la supervivencia.

Sin duda alguna, la sustitución del FeEDTA por FeEDDHA como fuente de hierro y la introducción del PG como componente del medio de cultivo, fueron el punto de inflexión necesario en el protocolo que permitió cerrar el ciclo de micropropagación. A pesar de que ambos factores fueron evaluados por separado, se puede considerar que son complementarios en la consecución de los resultados tal y como han sido aquí presentados.

Algunos autores, en otras especies de plantas, habían señalado la conveniencia de sustituir el FeEDTA por otros quelatos más estables y adecuados (Van der Salm *et al.*

1994, Nas y Read 2001). A pesar de que Ashrafi *et al.* (2010) hacen referencia a la eliminación de la clorosis en el nogal Persa, lo atribuyen al diseño de una composición mineral diferente a la presente en el DKW, no a la sustitución del FeEDTA por el FeEDDHA en el medio de cultivo. Amiri y Gharati (2012) también sustituyeron el FeEDTA por FeEDDHA en el cultivo *in vitro* del nogal pero no mencionan ningún efecto particular por tal motivo.

Por su parte el PG, también es ampliamente utilizado en el cultivo de tejidos con numerosos propósitos y en especies tan diferentes como *Solanum tuberosum* (Sarkar y Naik 2000), *Capsicum annuum* (Kumar *et al.* 2005), *Feijoa sellowiana* (Reis *et al.* 2008), manzano (Rustaei *et al.* 2009), *Ficus religiosa* (Siwach y Rani Gill 2011), entre otras. No obstante a ello, sus mecanismos de acción no han sido completamente dilucidados (da Silva *et al.* 2013). En nogal, el PG también ha sido utilizado por Leslie *et al.* (2005) y Sharifian *et al.* (2009), quienes encontraron que su incorporación en el medio de cultivo de multiplicación es beneficiosa para mejorar el enraizamiento; resultados que contrastan con los aquí expuestos, contribuyendo así a añadir más incertidumbre sobre sus posibles usos y efectos.

Ensayar la utilización de diferentes concentraciones de sacarosa durante la pre-inducción radical, así como evaluar la idoneidad de diferentes fuentes de carbono durante la fase de expresión ha permitido consolidar y aprovechar las modificaciones introducidas en las etapas previas al enraizamiento.

Pero alcanzar este punto habría sido imposible si no se hubiera desarrollado un protocolo de introducción y establecimiento que hiciera posible contar con cultivos viables de algunos de los árboles seleccionados por sus características sobresalientes. No obstante este proceso necesita ser perfeccionado hasta el punto de convertirlo en una metodología rutinaria y más eficiente.

El resultado final de toda esta investigación ha sido desarrollar la capacidad de completar el ciclo de micropropagación de todos los genotipos establecidos exitosamente *in vitro*. La optimización de algunos pasos del protocolo de propagación ha permitido producir cerca de 10 000 rametos de 14 genotipos diferentes desde el año 2010 al 2015, siendo plantados la mayoría de ellos en condiciones de campo. También ha ofrecido la oportunidad de perfeccionar el programa de mejora para la producción de madera del nogal híbrido por medio del establecimiento de ensayos clonales.

4.2 Genotipado por medio del uso de marcadores de ADN del tipo SSR

El desarrollo de esta tarea parte de la necesidad de disponer de una herramienta sólida, relativamente barata, sencilla y repetible para genotipar las selecciones de nogal híbrido

maderero. Por estas razones se decidió utilizar marcadores del tipo microsatélites. Además de tener la necesidad de trazar el perfil genético de los árboles plus, poseer una metodología robusta de clasificación genética serviría para monitorizar, evaluar y validar el protocolo de micropropagación.

4.2.1 Evaluación del poder discriminante de los microsatélites de la genoteca creada por Woeste et al. (2002) para *J. nigra*, en el híbrido maderero

El uso de marcadores moleculares para construir el perfil genético de los árboles plus era una tarea en extremo importante. La población objeto de estudio provenía de un cruce de polinización abierta entre *J. major* var. 209 y *J. regia*. En principio, el progenitor femenino (MJ209) es un clon, mientras que un número indeterminado de árboles, pocos en principio, de nogal Persa actuaron como progenitores masculinos.

A pesar de que la biblioteca de microsatélites creada por Woeste et al. (2002) poseía una gran cantidad de marcadores SSR que habían sido utilizados en varias especies e híbridos de la familia *Juglandaceae*, se había reportado un polimorfismo variable, dependiendo del grado de parentesco con la especie para la cual fueron desarrollados. Por ejemplo, Ross-Davis y Woeste (2008) evaluaron 10 de éstos marcadores, determinando que efectivamente podían ser utilizados para la caracterización genética de diferentes especies de nogal y sus híbridos, sin embargo algunas de las parejas de *primers* fueron incapaces de amplificar en individuos de diferentes secciones a la de *J. nigra* (*Rhysocaryon* – *Trachycaryon*). También fue significativo el diferente grado de polimorfismo registrado, normalmente más bajo entre las especies de las secciones *Juglans* y *Cardiocaryon*. No obstante, aunque era probable que algunos de los marcadores de esta genoteca no amplificaran en el híbrido maderero y que el grado de diferenciación obtenido no fuera suficiente para discriminar entre individuos con un alto grado de parentesco, se decidió evaluar algunas de las parejas antes de proceder a la realización de una tarea más compleja, como es el diseño de marcadores específicos.

Como se puede observar en la **Fig. 29** y en la **Tabla 22** el procedimiento desarrollado para la extracción y purificación del ADN genómico fue adecuado, permitiendo contar con un material genético de partida de suficiente calidad para el inicio de las amplificaciones, a pesar de que el rendimiento fue diferente para cada individuo. Por este motivo fue necesario estandarizar las muestras de trabajo a concentraciones uniformes (5 ng de ADN/μl) teniendo en cuenta los resultados anteriores. Una vez que se contaba con ADN genómico de calidad, se podía ya proceder a la amplificación con las parejas seleccionadas.

De las 10 parejas de *primers* se descartó el uso de 2 de ellas por razones diferentes. La primera, WGA 142, rindió productos de amplificación inadecuados, una vez que la cantidad de alelos/genotipo presentes era mayor que 2. Si consideramos que éste *locus* es heterocigótico, el número máximo de picos no debería superar éste valor, partiendo del principio de que los individuos eran diploides, como quedó demostrado con el uso de los otros *loci*. La causa de este comportamiento podría ser, o una baja especificidad de unión al ADN molde o la existencia varios sitios de unión en el genoma del híbrido.

Fig. 29 Comprobación de la integridad del DNA genómico mediante electroforesis en geles de agarosa-TBE. Cada carril contiene DNA genómico de un único genotipo

Esto supuso un inconveniente inicial pues según Ross-Davis y Woeste (2008) era un *locus* especialmente informativo tanto en *J. major* (11 alelos) como en *J. regia* (20 alelos), por lo que cabría esperar que rindiera un polimorfismo elevado. Esta fue una de las primeras evidencias que sugería que fuera necesario desarrollar un *set* específico de marcadores para el híbrido maderero.

El segundo *locus* descartado fue el WGA033 pues, a pesar de que las bandas fueron perfectamente visualizadas en agarosa de alta resolución (MetaPhor), los productos de

la PCR fueron prácticamente indetectables mediante el secuenciador automático, una vez que los picos estaban ausentes o no eran fiables. Prescindir de este otro marcador supuso un contratiempo una vez que, a diferencia del WGA142, el WGA033 rendía patrones alélicos adecuados (en geles de agarosa) para su utilización en estudios de genotipado, pero al no poder interpretar sus productos de amplificación, el proceso de automatización quedaba entorpecido.

Tabla 22 Resultados de la cuantificación por espectrofotometría UV del contenido de ADN genómico/muestra

Muestra	ng/μL	A260	A 260/280	A 260/230	Muestra	ng/μL	A260	A 260/280	A 260/230
D-A	10,32	0,206	1,72	0,81	D-20	14,0	0,28	1,88	0,88
D-B	44,52	0,89	1,84	1,08	D-21	36,03	0,721	1,81	1,57
D-C	16,1	0,322	2,0	1,25	D-22	40,31	0,806	1,73	0,5
D-D	15,46	0,309	1,83	1,05	D-23	9,35	0,187	1,48	0,84
D-E	11,13	0,223	1,52	1,29	D-28	20,09	0,402	1,91	1,48
D-F	11,61	0,232	2,12	1,29	D-31	21,24	0,425	1,9	1,19
D-G	40,57	0,811	1,78	1,89	D-32	15,31	0,306	1,48	1,01
D-H	9,43	0,189	1,81	0,5	D-33	25,65	0,513	1,76	0,9
D-L	20,28	0,406	1,59	1,08	D-34	20,38	0,408	1,82	0,81
D-M	22,3	0,446	1,69	0,79	D-48	14,94	0,299	1,71	0,83
D-N	22,99	0,46	1,71	1,34	D-49	8,85	0,177	1,56	0,73
D-O	15,57	0,311	1,91	1,78	D-50	46,97	0,939	1,75	1,54
D-01	19,81	0,396	1,84	1,14	D-51	14,69	0,294	1,81	0,88
D-03	7,52	0,15	2,14	1,48	D-53	5,84	0,117	1,29	0,79
D-04	15,53	0,311	1,81	1,2	D-54	11,89	0,238	1,75	1,06
D-05	12,17	0,243	1,65	1,2	D-55	13,44	0,269	1,82	0,85
D-06	11,19	0,224	1,92	1,16	D-56	13,17	0,263	1,52	0,9
D-07	11,12	0,222	1,88	2,31	D-57	17,68	0,354	1,8	1,18
D-08	8,73	0,175	1,67	1,07	D-58	8,91	0,178	1,68	1,09
D-12	9,99	0,2	1,74	1,41	D-59	12,51	0,25	1,91	0,63
D-13	31,3	0,626	1,95	1,52	D-60	6,24	0,125	1,76	1,04
D-14	9,01	0,18	2,02	0,74	D-61	8,49	0,17	1,6	0,48
D-15	11,69	0,234	1,7	0,91	D-62	10,64	0,166	2,97	0,87
D-16	10,05	0,201	1,43	0,9	D-63	31,33	0,627	1,78	1,55
D-18	18,45	0,369	1,65	0,75	D-64	7,67	0,153	2,11	1,0
D-19	12,77	0,255	1,79	1,24					

El resto de las parejas sí rindieron productos correctos y analizables. Únicamente se encontró irregularidades en 2 de los *loci*, una vez que no amplificaron en los genotipos D13 (WGA004), D18 y D33 (WGA221). Como se trataba de evaluar el polimorfismo de este *set* de marcadores no se consideró necesario ajustar más las condiciones para estos árboles y parejas pues era poco probable que aportaran información relevante que afectara el resultado final.

Tabla 23 Resultados de las amplificaciones en 50 árboles seleccionados y estadígrafos calculados

Locus	Alelos	Tamaño (pb)	Frecuencias alélica	H _{Esp} -H _{Obs}	PID	PID _{Sib}
WGA004	3	231-261	0,13-0,48	0,602-0,959	0,241	0,547
WGA082	4	171-189	0,02-0,56	0,598-0,420	0,337	0,557
WGA090	2	134-180	0,48-0,52	0,499-0,000	0,375	0,657
WGA147	2	183-191	0,12-0,88	0,211-0,000	0,644	1,105
WGA148	2	247-261	0,48-0,52	0,499-0,000	0,375	0,657
WGA204	3	168-187	0,29-0,38	0,663-0,760	0,188	0,486
WGA221	3	227-234	0,02-0,78	0,455-0,458	0,368	0,748
WGA256	5	224-289	0,02-0,28	0,75-0,900	0,104	0,407
24					3,499*10 ⁻⁵	2,154*10 ⁻²

pb, pares de bases. H_{Esp}, heterocigicidad esperada. H_{Obs}, heterocigicidad observada

Los *loci* WGA090, WGA147 y WGA148 fueron dimórficos, con una H_{Obs} igual a 0 para los 3 (Tabla 23), lo que indicaba, con bastante probabilidad, que para cada marcador uno de los alelos podría ser nulo teniendo en cuenta el carácter híbrido de los árboles, sin poder identificar de qué progenitor provenía. Las frecuencias de alelos nulos relativamente altas (0,33) calculadas para las parejas WGA090 y WGA148 son buen indicador de ello. También lo son las frecuencias de los alelos para ambos *loci*, presentes aproximadamente en el 50% de los casos. Aunque Ross-Davis y Woeste (2008) no obtuvieron productos de amplificación con el marcador WGA090 para ninguno de los 8 árboles de *J. regia* evaluados, inferir entonces que los alelos encontrados en el híbrido maderero pertenecerían al progenitor femenino podría ser muy arriesgado una vez que se necesitaría incluir más procedencias en el estudio, además de los progenitores del híbrido maderero. Comparaciones adicionales con otros trabajos no han podido realizarse pues este marcador no aparece publicado en el resto de la literatura consultada. Por el contrario los otros dos microsatélites, WGA147 y WGA148, resultaron ser suficientemente polimórficos tanto en *J. regia* como en *J. major* (Ross-Davis y Woeste 2008) por lo que el resultado obtenido aquí podría ser indicativo del alto grado de parentesco entre los individuos de la población objeto de estudio, sugiriendo una vez más la participación de pocos progenitores en los cruzamientos.

Más informativos fueron el resto de los marcadores. Con 3 alelos aparecen los *loci* WGA004, WGA204 y WGA221, con 4 la pareja WGA082 y el de mayor polimorfismo individual, el WGA256, con 5 alelos. A diferencia de los marcadores con el 100% de sus *loci* homocigóticos, las parejas WGA004 y WGA256 poseían más del 90% de sus posiciones heterocigóticas. Interesantemente en el *locus* WGA004 el alelo 231 estuvo presente en todos los árboles analizados lo que serviría para corroborar la hipótesis

inicial de la existencia de un único progenitor femenino. Caso más extremo fue el del alelo 234, perteneciente al marcador WGA221, que tuvo una frecuencia por encima del 75%, siendo indicativo de que es bastante común entre los progenitores, lo que disminuía su potencialidad para diferenciar individuos.

Una vez que la población objeto de estudio poseía un alto grado de parentesco, era importante conocer el valor real aproximado de la capacidad de diferenciación de los marcadores utilizados. Woods *et al.* (1999) postularon que $P_{random} < P_{Sib}$, donde P_{random} es la probabilidad de encontrar dentro de una población genotipos idénticos para un *locus* en particular y P_{Sib} es la misma probabilidad pero para una población de compuesta por hermanos. Por lo tanto, utilizar la PID en la población objeto de estudio constituiría una clara sobreestimación del poder discriminante del *set* de marcadores evaluado; siendo más correcto entonces calcular la PID_{Sib} . Waits *et al.* (2001) recalcaron en la necesidad de evitar este tipo de errores, así varios estudios en plantas también hacen este tipo de distinción cuando trabajan con poblaciones con una estrecha relación genética (Wiesner y Wiesnerova 2009, Cipriani *et al.* 2010).

Así, el uso conjunto de los 8 marcadores confiere una PID_{Sib} de al menos $2,154 \cdot 10^{-2}$, resultando insuficiente para genotipar en la muestra analizada de 50 árboles. Quizás para una población natural este valor podría bastar pero es evidente que no es el caso de una compuesta por medios hermanos. Al respecto, Waits *et al.* (2001) estimaron que una PI de entre 10^{-2} y 10^{-4} es suficiente para discriminar individuos en poblaciones salvajes de *Canis lupus*, *Ursus arctos* y *Lasiorynus krefftii*. A diferencia del caso anterior, cuando se trata de especies domesticadas con una base genética relativamente estrecha, como es el caso del perro, DeNise *et al.* (2004), recomiendan para la realización de pruebas de parentesco rutinarias utilizar un *set* de marcadores SSR con una capacidad discriminativa del orden de 10^{-5} a 10^{-8} . Aunque la PID_{Sib} es un estadígrafo conservador (Woods *et al.* 1999, Cipriani *et al.* 2010), se consideró más conveniente considerar su utilización en detrimento de la PID calculada para una población aleatoria. No obstante, se seguirán mostrando ambos valores a modo de poder hacer comparaciones con trabajos similares en el género *Juglans*.

Siendo así, se podía seguir dos alternativas posibles: (1) evaluar un mayor número de parejas o (2) diseñar un *set* de marcadores propios para el nogal híbrido maderero. Teniendo en cuenta el reducido poder discriminativo de los marcadores evaluados y debido a la escasez de marcadores del tipo SSR en la familia *Juglandaceae* se optó por la segunda opción.

4.2.2 Diseño, optimización y evaluación de un nuevo set de marcadores del tipo SSR

Esta ha sido una tarea muy compleja en su ejecución y de extrema laboriosidad. Al no disponer de la secuencia genómica del nogal fue necesario, antes de disponer de los marcadores, elaborar una biblioteca genómica enriquecida en regiones microsatélites. Esta tarea implicó una serie de pasos que se describirán a continuación, e implicaban,

- 1.- aislar el ADN genómico y someterlo a una digestión con endonucleasas para obtener fragmentos de entre 100-200 pb, aproximadamente,
- 2.- a continuación se desnaturalizarían los fragmentos y se hibridarían con oligonucleótidos apropiados para aislar microsatélites, para luego ser capturados con la ayuda de *dynabeads* para separar los fragmentos conteniendo microsatélites,
- 3.- una vez completado el paso anterior, se procedería a insertar los fragmentos aislados en plásmidos (pUC19) para transformar *Escherichia coli*, lo que permitiría determinar la abundancia relativa de microsatélites en las bibliotecas resultantes mediante la secuenciación de los insertos de los clones seleccionados al azar,
- 4.- una vez conocidas las secuencias nucleotídicas se procedería a identificar los posibles marcadores y diseñar las parejas de *primers* de acuerdo a parámetros predeterminados,
- 5.- por último sería necesario amplificar las regiones SSR utilizando los *primers* diseñados, lo que permitiría, previo ajuste individual de las condiciones de la PCR, analizar el polimorfismo de cada pareja y seleccionar los *loci* definitivos.

Los resultados del crecimiento de las colonias en medio LB suplementado con Ampicilina se muestran en la **Fig. 30**. Al contener un gen de resistencia al antibiótico, solo las bacterias portadoras de los plásmidos transformados fueron capaces de crecer en dicho medio. En principio, se asumió que cada colonia blanca presente correspondía a una única bacteria recombinante, por lo que cada *cluster* fue picado individualmente y en consecuencia se procedió a establecer la secuencia nucleotídica de un total de 700 colonias. De esta forma fue posible determinar los insertos que contenían microsatélites y sus respectivas regiones flanqueantes. En la **Fig. 31** aparece un ejemplo en el que se puede identificar una región SSR con el dinucleótido CA repetido 14 veces. A pesar de que se enriqueció para 4 motivos diferentes, se comprobó que aproximadamente un

80% de los clones correspondían a repeticiones CA/GA; mientras que el resto pertenecían básicamente a copias en tándem de los trinucleótidos AAT/ATG.

Fig. 30 Crecimiento de las colonias de *Echerichia coli* transformadas en un medio de cultivo suplementado con Ampicilina

4.2.2.1 Diseño de las parejas de primers

La edición de las secuencias de los clones se hizo con el programa BIOEDIT. Finalmente, las posibles parejas de *primers* para las amplificaciones se diseñaron con la ayuda del programa PRIMER 3.0.

Fig. 31 Secuencia de un inserto clonado en un vector pUC19. Cada pico corresponde a un nucleótido, que aparece representado por los colores verde(A), rojo (T), azul (C) y negro (G)

En la primera parte del diseño se definió un cierto intervalo de temperaturas de fusión (T_m) y de tamaños para el producto final de la PCR (**Tabla 6**). Establecidos estos parámetros, 360 parejas potencialmente útiles fueron seleccionadas. Este paso por sí solo no bastaba para la elección definitiva de los marcadores que se iban a utilizar para genotipar los árboles seleccionados, sino que antes se deberían ajustar las condiciones de amplificación y demostrar su utilidad para la tarea que habían sido diseñados. Como se verá en el capítulo siguiente, aunque eran posibles otras alternativas, los *primers* resultantes fueron más que suficientes para alcanzar los objetivos propuestos.

Tabla 24 Detalles teóricos de algunos de los loci encontrados en la genoteca enriquecida en repeticiones CA. Resultados del software PRIMER 3.0

Locus	Secuencia nucleotídica	Tamaño producto (pb)	T _m (°C)	To (°C)
JhA102	F: CCCTAATGTTTCGCTCTAGC R: CCAAAGGTGAGGGTACAAG	293	55,2 55,6	57,2
JhA103	F: AAGAGGGTGATTCCCTCAC R: GTAAAGCACAGTTTCATGTAAG	247	52,0 52,1	56,0
JhA105	F: TGAAGCAACATTTCCTTAC R: GAGCCGTGGTCTCTAACC	255	55,4 55,6	57,0
JhA109	F: GAGCTTCGTCGATCAGTTAGTC R: TTTGGTTAGTCATGCTGTTGAG	216	58,2 58,0	57,5
JhA111	F: CCTCCGTCATCACTCCTG R: TGTGCCTTTGGAATATTACG	280	57,5 57,9	57,9
JhA112	F: CGTGTCGAATATCTATGTGATG R: TTTCGCTTAAATAGTGGAAGG	192	55,7 56,3	56,5
JhA114	F: ACGGAGAGAAAAGTGATGGAG R: TCTGGTGCTGGAATGCTA	228	56,0 56,2	57,0
JhA115	F: ACCGTTTAGGTTCTCTCAAGC R: AAGTCATGCACCTGGCATAAC	132	57,6 57,8	56,0
JhA115a	F: GGCTTTGGCATTGGCTTA R: TTGGGGGTTCTGCTTCTG	254	59,8 59,8	58,4
JhA116	F: ATTTCCGAGGTTGAAGGTG R: TTGGGAGGGAGTGAGAGG	253	57,6 58,7	57,7
JhA122	F: TCCCAACAGTTACATGAGGC R: GGGGAGATGGAAATCAAAAC	270	58,6 58,3	58,0
JhA123	F: CACCTTTGCATCTTTTGTTCAC R: AGGGTTTTCAAGTGTCGTTTTTC	141	59,7 59,5	56,8
JhA125	F: TTTCAATATGGAATCCTGTACC R: AGGCATTCTCAACAGAACAA	222	55,7 55,9	56,8
JhA128	F: TGGAAGTGAAGCAATATGTTTC R: CCTTTTGAATCGTACTACAAA	201	56,9 56,1	56,7
JhA129	F: TCGCACCTACACTGGTATTAG R: GCTATTGAGCAACAAAATGAG	182	55,5 55,3	56,3
JhA129	F: TTTGTTGCTCAATAGCTTGTAC R: AGCTCTACGGAACCCCTTAC	188	55,0 55,2	56,3
JhA131	F: CAAACTCAAATCTTCCTCAAAC R: GCTTGTCCAAAAGTATGGTG	147	55,7 55,7	55,8
JhA132	F: GAATGTTAGGCTTTGGTTGAC R: GGGAAGGTTTTAGACACCC	212	56,4 56,0	56,8
JhA134	F: TGTAGGAATCCGAAGAGTTG R: AGGTAAAGAGTGTTGCCACTAC	251	55,4 55,3	57,0
JhA201	F: GCATCCAAAGGTAAGTTAGAAG R: TGGACCCTAGAACACAACA	186	55,0 54,8	56,2
JhA202	F: TGGGATTTTGTGTGAAGGG R: ACCAGTTGTCACCATCTGTC	201	55,9 55,8	56,7
JhA203	F: TCCCAGTCACCTCAGAAAC R: GGTTCCCACTAATCATAGAA	180	56,0 55,8	56,4

Tabla 24 Detalles teóricos de algunos de los loci encontrados en la genoteca enriquecida en repeticiones CA. Resultados del software PRIMER 3.0 (continuación)

Locus	Secuencia nucleotídica	Tamaño producto (pb)	Tm (°C)	To (°C)
JhA204	F: CAGTTCCTTTTAGGGGTTCTC R: TCAGGTGAGGGATTTGATG	164	57,0 56,9	56,5
JhA206	F: ACATCGTTTAGGGGTGAATT R: TTCCCTTCCATTCTTTGC	191	56,0 56,1	56,6
JhA210	F: CATGGTTCTCAAGTACCTCTCC R: TGCAAGATTGAGAACTCTACG	285	57,8 57,3	57,8
JhA211	F: TCTCCTTCTTCTTCTCATTTC R: ATCGGTCTCGGCATAACTAC	171	56,8 56,8	56,6
JhA212	F: TCCCACGAATAACTTTCTGTT R: TTTAGCTCTTGCCACAATC	259	56,4 55,7	57,2
JhA213	F: CTATGGTTTTCTTTGTGAGACC R: GTGCCTTTGGAATTATTACG	239	55,6 55,0	56,8
JhA214	F: TAGCAGCGTCCCTATAACTG R: GCACTCTCGAATTGTCAAAC	212	55,8 55,9	56,8
JhA216	F: GCAC GACAAAGAAT CACCC R: TCGGGGAGGGAAATAGAAC	136	59,1 58,9	56,5

F, cebador líder. R, cebador inverso. pb, pares de bases. To, temperatura óptima de *annealing*

En la **Tabla 24** se muestran algunas de las parejas pertenecientes a la genoteca enriquecidas con repeticiones CA; igual resultado fue obtenido para la biblioteca con repeticiones GA. Para cada posible *locus* microsatélite se indica su nombre, el tamaño esperado del producto de PCR, la secuencia nucleotídica, las temperaturas teóricas de fusión por oligonucleótido (Tm) y por pareja (To). Los pares de *primers* microsatélites fueron denominados de acuerdo a la genoteca de donde provenían. Para los de la biblioteca CA se utilizó la letra A y para los de la GA comenzaban por B, seguidas por un número con 3 posiciones correspondientes al orden en que fueron secuenciadas. Todas irían precedidas por Jh, para designar su procedencia: *Juglans* híbrido.

4.2.2.2 Optimización de los parámetros para la PCR y validación de la metodología

En este capítulo se describirá el proceso de optimización de las condiciones para las amplificaciones. El propósito perseguido era obtener productos interpretables y resultados repetibles. Para ello se utilizó ADN genómico de ejemplares individuales: híbridos MJ209xRa, así como ejemplares silvestres de *J. regia*. Estos experimentos permitieron descartar *primers* de baja especificidad, que daban lugar a bandas artefactuales y que producían inconsistencias en las réplicas.

Para cada pareja de cebadores se determinó las condiciones óptimas de la PCR, con particular énfasis en la temperatura de *annealing*, buscando una mayor especificidad de unión y mejor calidad de los resultados de las amplificaciones. Esto permitió realizar una selección de los marcadores, no solo en función de su calidad sino de su reproducibilidad.

Fig. 32 Electroforesis de alta resolución en gel MetaPhor mostrando los productos de amplificación de las parejas JhA134 (carriles 1-7) y JhB135 (carriles 9-15). Cada carril corresponde a un genotipo, excepto el central que es un indicador de tamaño alélico

Como sucede en trabajos de este tipo, muchos de los *primers* también tuvieron que ser rechazados pues no resultaron de utilidad para el fin al que estaban destinados. Por ejemplo, en la **Fig. 32** están representados los productos de amplificación de dos marcadores pertenecientes a ambas genotecas, JhA134 y JhB135. Como se puede observar, con la pareja JhA134 se obtienen resultados perfectamente interpretables, con bandas de buena intensidad; sin embargo, aunque se pueden diferenciar varios *loci*, estos eran monomórficos, por lo que fue descartada una vez que su poder discriminante estaba muy limitado por esta causa, prefiriendo en este caso el predominio marcadores dimórficos. Por su parte, con el marcador JhB135 uno de los alelos se manifestaba con una muy baja intensidad, lo que dificultaba determinar su presencia en ocasiones, así como asignar el valor correspondiente, quedando reducida de esta forma la exactitud del proceso de genotipado. Por esta razón, luego de ser marcado el cebador líder con un fluoróforo, sus productos de PCR fueron analizados por electroforesis capilar. Al poseer una mayor resolución este método, pudieron ser identificadas perfectamente todas las variantes alélicas (**Tabla 26**). Es cierto que este marcador demostró poseer un

polimorfismo no muy elevado, pero aun así, tener la posibilidad establecer todas sus variantes alélicas añadió fortaleza a todo el *set*.

Por su parte, las parejas JhA226 y JhB216 ofrecieron un polimorfismo bastante elevado, estando representado cada *locus* por 2 alelos perfectamente diferenciables (**Fig. 33**). Además, en sólo 7 individuos se pudieron detectar la presencia de hasta 4 *loci* alélicos para la pareja JhA226 y 5 para la JhB216, lo que sin dudas incrementaba el poder discriminativo individual y global. Marcadores de este tipo eran los preferidos para emprender la tarea de distinguir entre individuos con un alto grado de parentesco.

Fig. 33 Electroforesis de alta resolución en gel MetaPhor mostrando los productos de amplificación de las parejas JhA226 (carriles 1-7) y JhB216 (carriles 9-15). En el carril central es un indicador de tamaño alélico

De la genoteca GA, otro candidato a ser descartado fue el *locus* JhB102 pues uno de sus alelos era igual para todas las muestras; lo que limitaba su capacidad individual de diferenciación (**Fig. 34**). Pero al contar con el precedente de la pareja JhB135, se decidió igualmente someterla a su análisis por electroforesis capilar. Los resultados de los geles se confirmaron: el alelo 189 estuvo presente en todas las muestras, con una frecuencia exacta del 50%; sin embargo todos los individuos fueron heterocigóticos para este *locus* (**Tabla 26**). Estos resultados sugieren el genoma de uno de los progenitores está

presente en toda la descendencia. En este caso, conociendo la participación de varios padres, se podría asumir que este alelo proviene de la madre (Mj209).

Otros *primers* se descartaron porque era complicada la asignación de los tamaños alélicos o simplemente por la imposibilidad de amplificar en la muestra escogida, tornando sus resultados irrepetibles.

Fig. 34 Electroforesis de alta resolución en gel MetaPhor mostrando los productos de amplificación de la pareja JhB102. En el carril de la extrema izquierda se ubica el indicador de tamaño alélico

Dentro del proceso de optimización, se estableció la factibilidad de utilizar fuentes diferentes de ADN. Así, se comprobó que era posible obtener suficiente ADN de calidad a partir de yemas y ramas tiernas siguiendo el mismo protocolo de extracción que para las hojas, lo que sin dudas constituye una ventaja, al no tener que restringir la época de recolección de material de partida al período vegetativo.

Con el mejoramiento de las condiciones de amplificación, también aumentó la capacidad de discriminación conjunta de las parejas que no fueron descartadas. Con este proceso de optimización, de las 360 parejas diseñadas inicialmente (180 para cada genoteca), sólo 85 pasaron a la siguiente fase, 47 de la genoteca CA y 38 de la genoteca GA. No obstante a ello, se consideró oportuno realizar un nuevo reajuste, depurando aquellos

marcadores para los que, por ejemplo, un único alelo mostraba frecuencias muy elevadas, en algunos casos, cercanas a 1, o *loci* que no producían resultados consistentes.

Para este nuevo paso, las parejas fueron marcadas con flouróforos para utilizar un sistema de interpretación más sensible. En este caso se utilizó el ADN de 18 nuevos árboles de semilla del híbrido maderero. El objetivo de este reajuste era simplificar al máximo el proceso de genotipado, utilizando el menor número posible de marcadores, que poseyeran en conjunto un alto poder discriminativo para analizar una población con una estrecha base genética.

Como quedó establecido, un marcador útil sería aquel que, además de amplificar en la muestra elegida y sus productos fueran interpretables, tuviera un polimorfismo

Fig. 35 Electroferogramas de los productos de amplificación de dos parejas de primers. A la izquierda, la JhA214 marcada con el flouróforo PET (rojo) y, a la derecha la JhA101 marcada con 6-FAM (azul). Cada línea horizontal representa un genotipo

razonablemente alto, teniendo en cuenta el alto grado de parentesco que poseía el nogal híbrido maderero. Poseer un único alelo presente en todos los individuos daba al traste con este principio, pues disminuía el número de combinaciones posibles a alcanzar. Así, en una primera aproximación se pudo comprobar que la pareja JhA214, al igual que la JhB102, poseía 1 alelo que estaba presente en los 18 individuos analizados (**Fig. 35**), convirtiéndose en candidata para ser eliminada. Sin embargo, al aumentar el tamaño de la muestra en el siguiente paso, los resultados alcanzados hicieron posible que se decidiera mantenerla (ver siguiente capítulo). No obstante, este comportamiento venía a reafirmar la hipótesis de que la población con que se trabajaba pertenecía a una descendencia híbrida, al menos en un alto porcentaje. Por su parte la pareja JhA101 rendía patrones demasiado heterogéneos, haciendo complicada la asignación de los tamaños alélicos (**Fig. 35**). Este problema no pudo resolverse aumentando la temperatura para incrementar la especificidad de unión y de esta forma eliminar los

picos que correspondían a falsos alelos. Por estas razones este marcador sí fue rechazado.

De esta manera, el proceso que comenzó con la secuenciación de más de 700 clones, culminó con sólo 24 parejas de *primers* que serían la base para el genotipado de los árboles plus.

4.2.2.3 Genotipado del material seleccionado y determinación del poder discriminante conjunto del set de marcadores

En la **Tabla 25** aparece un resumen de algunas características de las 24 parejas seleccionadas para el genotipado. Como ya se señaló antes, éstas fueron elegidas básicamente porque rindieron productos de amplificación interpretables para todas las muestras analizadas, por su capacidad informativa potencial y por la facilidad para asignar los tamaños alélicos a partir de los electroferogramas. Ahora sólo era necesario proceder a un análisis más amplio, que incluyó 50 genotipos de semilla.

Conscientes de que se debía extraer el máximo poder discriminativo del *set* de marcadores diseñados, se fijó en 24 el número de parejas que se emplearían en el paso final. A pesar de que esta cantidad podría parecer excesiva, otros autores han reportado el uso de más 30 ó más marcadores en nogal (Woeste *et al.* 2002, Topcu *et al.* 2015).

En un último ejercicio de optimización, *primers* como el JhA214, fueron evaluados en una muestra de mayor tamaño. Los resultados en este caso confirmaron casi por completo los alcanzados cuando se analizaron solo 18 individuos: había un alelo (el 183) con una frecuencia cercana al 50%. Sin embargo, de los 50 árboles que incluía este análisis se pudo identificar uno que poseía 1 alelo (el 185) no encontrado en el resto de la muestra. A pesar de ello, todos los *loci* fueron heterocigóticos (**Tabla 26**). Estos hechos concuerdan con postulados anteriores y sugieren la existencia de un alto grado de parentesco de la población objeto de estudio así como el predominio del estado híbrido de la progenie.

Como era de esperar, la mayoría de los marcadores rindieron una cantidad relativamente baja de variantes alélicas (**Tabla 26**). En general, muchos de los marcadores (10 en total) permitieron distinguir solo 3 alelos por muestra analizada. Únicamente sólo 2 *loci* (JhA222 y JhA230) tuvieron 2 alelos y, como era de esperar, fueron homocigóticos en todas sus posiciones. Este comportamiento pudo estar motivado por la presencia de *loci* homocigóticos y/o por la presencia de alelos nulos en los progenitores. Marshall *et al.* (1998) señalan que el análisis de la presencia de alelos nulos, especialmente cuando éstos poseen frecuencias muy bajas, suele conducir a

errores de interpretación. Una vez que el objetivo de este trabajo era solo trazar el perfil genético de los árboles plus, se decidió prescindir de este tipo de análisis.

Tabla 25 Selección definitiva de las parejas de primers utilizadas para el genotipado de los árboles plus y algunas de sus principales características

Locus	Secuencia 5'→ 3'(a)	Patrón repetido	TO (°C)
JhA103	F: AAGAGGGTGATTCTCAC R: GTAAAGCACAGTTTCATGTAAG	(TA) ₅ (CA) ₃₄	60
JhA123	F: CACCTTTGCATCTTTTGTTCAC R: AGGGTTTTCAAGTGTCGTTTTTC	(CA) ₂₆ (TA) ₂	60
JhA128	F: TGGAAGTGAAGCAATATGTT T C R: CCTTTTGAATCGTACTACAAA	(AT) ₄ (GT) ₁₂	60
JhA201	F: GCATCCAAAGGTAAGTTAGAAG R: TGGACCCTAGAACACAACA	(G) ₁₉ TT(GT) ₂ T(GT) ₂	55
JhA214	F: TAGCAGCGTCCCTATAACTG R: GCACTCTCGAATTGTCAAAC	(CT) ₉ (CA) ₃ CC(CA) ₁₇	55
JhA221	F: AGCCACGATACAAACACAAAC R: AGGATAAAATGCTTGCGAATAG	(CA) ₉	58
JhA222	F: AACACCACCACCACTAAGTTC R: TTCTGCTCTTCCCTCACTAAG	(CA) ₁₂	58
JhA227	F: GGTAGGGTCATTGGAACATAG R: GGCGTACTCTGGAGACATATAG	(CT) ₁₅ (CA) ₁₄	58
JhA230	F: AGTGGCAATCTCAAGGAAG R: TCTCCGTTTCATCTCATTCTC	(GT) ₁₂ (GA) ₁₇ GCAAA(G) ₃	55
JhA243	F: TTGCATCCAAATAGCTGTCC R: TTGCTGGGAAGTACTGCATC	(CA) ₆ CG (CA) ₁₁	55
JhB102	F: TGACATGGTGTTTCATAACTCAG R: GTCAACAGGCAAAGAACTAGAC	(CT) ₁₇ (CCCT) ₃	55
JhB105	F: TAGCCTCGTTCCAGGTTCTATA R: CCTAGAGGTAGATGCGGTAGAG	(CT) ₅ CCACGTTAT(CT) ₂₃	62
JhB107	F: TAGCCAACCTTTGTTTGAAGTTC R: TCGGACACAACCTTACAACCAC	(CT) ₂₇	60
JhB111	F: GCCTGTGGTCAGTGTTCA R: GACGGGGAAGAAATCAAG	(CT) ₂₂	55
JhB120	F: AGGTGGGAATATGACACTGTAC R: AATCGTGGTGCTTATTAGATTTC	(GA) ₁₅	55
JhB135	F: CATTTTCAGCCTCTTGAAGTTC R: ATAGCGTAACCAGCTCCTTG	(GT) ₇	55
JhB206a	F: ATCGTCTCTCTCTCAGTGTCTC R: AACCGTCTATATCAGTCTCAGC	(CT) ₁₈	60
JhB210	F: GCAAGCACGATAGAAAGGAC R: GGGATACCTCTGATGCCTAAG	(CT) ₂₅	60
JhB216	F: TCCCTTTAGCATCTATGAAGTTC R: GATGGTGAATGTTTCTGTACTG	(CT) ₁₄ (CA) ₁₄	57
JhB222	F: TAACATACACACGCAAACACAG R: GAGGGCACACCCACTAAG	(CA) ₂ (GA) ₂₁	55

Tabla 25 Selección definitiva de las parejas de primers utilizadas para el genotipado de los árboles plus y algunas de sus principales características (continuación)

Locus	Secuencia 5'→ 3'(^a)	Patrón repetido	TO (°C)
JhB224	F: CCAGCAGGAGAGTCTTCG R: AGCACACCATAGAGAGAAAACA	(CT) ₁₄	55
JhB227a	F: ATGCGTGCTTATCTGTTTAGC R: TCAAGTGTGGATGGGACTATC	(CT) ₂₆ (CA) ₉	55
JhB233	F: GGACTACGCGGATTTAGTG R: CTGGTCCCCGTTTAGGTA	(GT) ₇ (AG) ₁₅	55
JhB236	F: CAGGTCCTCCTTCTCTTTC R: GCCTCTTCGTATCTGTTTCTC	(CT) ₂₃	55

F, cebador líder. R, cebador inverso. TO, temperatura óptima de *annealing*

De los 24 marcadores 10 poseían todas sus posiciones en estado heterocigóticas, algo bastante lógico, y esperado, en una población híbrida; mientras que solo 4 fueron completamente homocigóticos. Resultados similares fueron reportados por Pollegioni *et al.* (2009), quienes encontraron que 9 de los 10 *loci* investigados en un híbrido de nogal fueron heterocigóticos. Por su parte, 6 parejas registraron valores de heterocigocidad por debajo de 0,500. Este es un dato importante a tener en cuenta a la hora de elegir un *set* de marcadores. Al respecto, Paetku (2003) sugiere una serie de principios *ad hoc* basados en los datos de H_{Obs} para establecer un número adecuado de marcadores. Considera que para 6 microsatélites la H_{Obs} debe oscilar entre 0,7 y 0,8; debiéndose aumentar su número en la medida que la heterocigocidad individual disminuye.

Con la pareja JhB224 se registró la más baja probabilidad de identidad, condicionada probablemente por la elevada frecuencia de uno de sus alelos (0,760) y por el reducido valor de H_{Obs} (0,040). Por su parte, el *locus* más informativo fue el JhB227a, seguido muy de cerca por el JhB120; ambos con una H_{Obs} igual a 1. En general, los 24 marcadores ofrecen un poder discriminativo lo suficientemente alto como para poder diferenciar individuos dentro de la población objeto de estudio. Incluso, eligiendo solo los 8 marcadores más informativos se podría disponer de una capacidad de diferenciación relativamente alta, con un valor de PID_{Sib} de $1,1047 \times 10^{-4}$. Estos resultados superan considerablemente los alcanzados con los 8 marcadores de la genoteca WGA (Woeste *et al.* 2002), con la que se logró un valor de PID_{Sib} de solo $2,154 \times 10^{-2}$. Resulta comprensible que éstos marcadores, diseñados a partir de y para otra especie de nogal funcionen mucho peor en el híbrido maderero. Se sabía que el alto grado de parentesco, condicionado por la presencia de un único progenitor femenino y unos pocos padres, sería un serio inconveniente que habría que superar.

Tabla 26 Resultados de las amplificaciones en 50 árboles seleccionados y estadígrafos calculados

Locus	Alelos	Tamaño (pb)	Frecuencias alélica	H _{Esp} -H _{Obs}	PID	PID _{Sib}
JhA103	3	114-244	0,070-0,630	0,508-0,160	0,318	0,658
JhA123	5	138-168	0,020-0,550	0,544-0,200	0,301	0,610
JhA128	3	148-202	0,290-0,400	0,659-0,580	0,189	0,488
JhA201	3	178-186	0,060-0,480	0,554-0,000	0,299	0,596
JhA214	4	183-212	0,010-0,490	0,622-1,000	0,215	0,528
JhA221	3	196-208	0,230-0,050	0,624-1,000	0,212	0,526
JhA222	2	149-155	0,395-0,604	0,478-0,000	0,387	0,686
JhA227	3	155-167	0,280-0,440	0,649-0,560	0,196	0,499
JhA230	2	160-163	0,448-0,581	0,494-0,000	0,377	0,663
JhA243	3	157-172	0,260-0,480	0,634-0,520	0,205	0,515
JhB102	3	189-211	0,190-0,500	0,617-1,000	0,219	0,532
JhB105	3	184-211	0,020-0,600	0,495-0,000	0,359	0,667
JhB107	6	171-205	0,010-0,550	0,565-0,020	0,269	0,589
JhB111	4	181-195	0,020-0,600	0,565-0,020	0,284	0,602
JhB120	6	165-197	0,010-0,290	0,552-1,000	0,105	0,408
JhB135	3	184-191	0,170-0,460	0,753-1,000	0,220	0,526
JhB206a	6	148-248	0,010-0,250	0,622-0,340	0,171	0,489
JhB210	4	195-221	0,020-0,480	0,663-1,000	0,296	0,595
JhB216	4	127-151	0,130-0,390	0,714-1,000	0,134	0,441
JhB222	5	130-155	0,010-0,550	0,608-0,326	0,238	0,547
JhB224	3	114-125	0,180-0,760	0,386-0,040	0,418	0,828
JhB227a	5	197-239	0,040-0,260	0,767-1,000	0,094	0,397
JhB233	4	150-171	0,180-0,330	0,79-1,000	0,116	0,419
JhB236	4	160-174	0,220-0,280	0,748-1,000	0,111	0,412
91				1,49811*10 ⁻¹⁶	4,11675*10 ⁻⁷	

pb, pares de bases. H_{Esp}, heterocigocidad esperada. H_{Obs}, heterocigocidad observada.

Con los microsatélites de la biblioteca WGA, muchos autores han logrado buenos resultados, para los más diversos fines. Por ejemplo, Ross-Davis *et al.* (2007), realizaron un estudio de diversidad dentro de la familia *Juglandaceae* en el que solo emplearon 10 parejas de esta genoteca, logrando diferenciar entre 15 especies e híbridos diferentes, llegando incluso a establecer relaciones de parentesco entre ellos. Ruiz-García *et al.* (2011), por su parte, con un *set* de 19 de marcadores WGA registraron un poder discriminativo promedio por *locus* de 0,26; suficiente para diferenciar entre 57 árboles de nogal común provenientes de colecciones de EUA y España.

En una aproximación, en la que se pretendía determinar la potencialidad de los marcadores diseñados y aquí presentados, se decidió probarlos en una procedencia diferente (HII) a la aquí utilizada (HI), pero también perteneciente al híbrido Mj209xRa.

Con tal fin, se escogieron 20 individuos de semilla de los suministrados por Arboforest (<http://www.arboforest.com/>) para el establecimiento de los ensayos clonales. Se siguió el mismo procedimiento para la amplificación e interpretación de los *loci* descritos anteriormente en HI, excepto que como material de partida para las extracciones de ADN se utilizaron yemas dormantes. Con el propósito de genotipar esta muestra poblacional se seleccionaron 10 marcadores (**Tabla 27**), 8 de los cuales corresponden a la selección de los 24 *loci* microsatélites diseñados *de novo*, más otros dos de la genoteca WGA.

Tabla 27 Resultados de las amplificaciones en 20 árboles semilla del híbrido Mj209xRa de una procedencia diferente y estadígrafos calculados

Locus	Alelos	Tamaño (pb)	Alelos nuevos	H _{Esp} -H _{Obs}	PID	PID _{Sib}
JhA123	2	140-168	0	0,355-0,900	0,479	0,869
JhA214	12	183-223	8	0,815-0,826	0,053	0,364
JhA221	7	196-212	4	0,778-0,769	0,083	0,389
JhB107	3	191-201	0	0,592-1,000	0,232	0,562
JhB120	7	164-197	2	0,731-0,731	0,108	0,429
JhB216	11	125-168	8	0,858-0,885	0,035	0,332
JhB227a	6	197-239	2	0,748-0,539	0,100	0,414
JhB236	10	154-184	6	0,808-0,885	0,063	0,367
WGA004	11	231-260	9	0,815-0,846	0,058	0,362
WGA256	10	218-256	8	0,813-0,615	0,059	0,364
79			47		3,984*10⁻¹¹	1,972*10⁻⁴

pb, pares de bases. H_{Esp}, heterocigocidad esperada. H_{Obs}, heterocigocidad observada

Efectivamente, los *loci* microsatélites seleccionados funcionaron en esta nueva procedencia. Excepto 2 parejas (JhB227a y JhWGA256), el resto reportó valores de heterocigocidad por encima de 0,7. A pesar de haber utilizado sólo 10 marcadores, en una muestra formada por únicamente 20 árboles, afectados por un elevado grado de parentesco, se obtuvo una PID_{Sib} de 1,972*10⁻⁴. A primera vista, este resultado podría parecer insuficiente de acuerdo a DeNise *et al.* (2004), quienes recomiendan utilizar para este tipo de población una PID del orden de 10⁻⁵ como mínimo. Pero si se tiene en cuenta que se registraron 47 nuevos alelos en una población tan pequeña y que los valores de H_{Obs} son elevados, es lógico esperar que para muestra poblacional mayor el polimorfismo sea por consiguiente más elevado. Individualmente, el marcador más informativo fue el JhB216, situándose en el extremo contrario la pareja JhA123.

A pesar de que tanto HI como HII son progenies de híbridas *Juglans x intermedia*, su estructura genética es diferente, como ya se ha venido analizando. A diferencia de HI, en HII la heterocigocidad observada para los *loci* JhA123 y JhB107 es igual a 1. Sin dudas, esta es una clara sobreestimación de sus verdaderos valores, consecuencia

probablemente de una frecuencia de alelos nulos negativa (-0,402 y -0,256, respectivamente), como señalara Marshall *et al.* (1988).

Considerando los resultados conjuntos alcanzados en esta procedencia, se podría inferir, aunque no sea objeto de estudio de este trabajo, que existe una mayor variabilidad entre los híbridos de Arboforest (HII), revelando por consiguiente la estrecha base genética de la procedencia objeto de estudio (HI).

Estos resultados son un reflejo de la potencialidad de los microsatélites diseñadas *de novo*, lo que abre la posibilidad de poder ser utilizados en otras especies de la familia *Juglandaceae* y servir de complemento a los dos sets de marcadores publicados hasta el momento (Woeste *et al.* 2002, Wu *et al.* 2012).

En un último apunte sobre el uso de esta genoteca, se utilizaron 8 marcadores (JhA123, JhA214, JhA221, JhB107, JhB120, JhB216, JhB227a y JhB236) para determinar si la tecnología de propagación *in vitro* utilizada era propensa a provocar mutaciones genéticas. Estos se complementaron con 2 *loci* de la biblioteca de Woeste *et al.* (2002): WGA004 y WGA256. Para ello se escogieron vitroplantas en multiplicación activa. Luego de eliminar los callos basales, el resto del material se utilizó para las extracciones de ADN. Se escogieron para la prueba los genotipos DA, DE, DL, DM, DN, D12, D15, D48, D51, D53, D63 y D117. Además de poder discriminar con una PID_{Sib} de $1,699 \cdot 10^{-3}$, al comparar sus perfiles genéticos con los de los respectivos árboles padre no se registró ninguna alteración de los patrones alélicos; por lo que se podría asumir que el protocolo de micropropagación utilizado no provoca cambios genéticos, al menos en las regiones del genoma exploradas.

4.2.3 Discusión

Disponer de un sistema de clasificación genética dentro de un programa de mejora es de vital importancia. Aunque existe una gran variedad de pruebas de ADN, muchas de ellas son complicadas en su ejecución y adolecen normalmente de consistencia, lo que dificulta poder contrastar los resultados entre diferentes laboratorios (Jones *et al.* 1997).

Los marcadores microsatélites resuelven estas limitaciones y son utilizados no solo para identificar y discriminar entre individuos, sino que también son de gran aplicabilidad en estudios de flujos migratorios, para determinar la estructura genética de las poblaciones, en la construcción de mapas genéticos, entre las más importantes (Morgante y Olivieri 1993, Glenn y Schable 2005). Si bien es cierto que no todos los estudios (McGregor *et al.* 2000, Saini *et al.* 2004, Ahmed *et al.* 2012) en este sentido son tan unánimes, en el caso del nogal híbrido maderero se decidió utilizar marcadores SSR pues era

necesario desarrollar un sistema de clasificación relativamente barato, sencillo y potente que permitiera distinguir entre individuos con un alto grado de parentesco.

En el momento de iniciar el presente trabajo existía publicada una única genoteca enriquecida de regiones SSR creada específicamente para nogal negro (Woeste *et al.* 2002). Varios autores, como Dangl *et al.* (2005), Foroni *et al.* (2005), Victory *et al.* (2006), Foroni *et al.* (2006), Robichaud *et al.* (2006), Ross-Davis y Woeste (2008), Wang *et al.* (2008) y Topcu *et al.* (2015), entre otros, han utilizado marcadores de esta biblioteca en diferentes especies de la familia *Juglandaceae*, con los más diversos fines.

Tomando como referencias los buenos resultados alcanzados con estos *loci* microsatélites, en una primera aproximación, se decidió probar su efectividad y funcionalidad en el nogal híbrido maderero, persiguiendo 2 objetivos básicos: (1) trazar el perfil genético de los árboles plus y (2) poder diferenciarlos.

Conscientes de que se debía superar la barrera que imponía el hecho de que la población objeto de estudio estaba formada por medios hermanos, provenientes del cruce entre un único progenitor femenino y unos pocos padres, cabía la posibilidad de que esa estrecha base genética fuera la causa del mal funcionamiento de los marcadores de la genoteca creada por Woeste *et al.* (2002). A pesar de que 8 de los 10 *loci* seleccionados de esta biblioteca rindieron productos de amplificación interpretables, la capacidad discriminante fue más bien pobre.

Siendo así se procedió a desarrollar un *set* de marcadores SSR, diseñados específicamente para el híbrido maderero. Una vez que no se disponía de la secuencia del genoma de ningún nogal, fue necesario crear genotecas enriquecidas con regiones microsatélites que servirían de base para el diseño de las parejas de *primers*. Se crearon dos bibliotecas, con repeticiones CA, una, y GA, la otra, una vez que cerca del 80% de los clones poseían este tipo de repetición. Morgante y Olivieri (1993), en una búsqueda en el EMBL y en el GenBank, de regiones microsatélites en plantas superiores (pertenecientes a 13 familias de dicotiledóneas y 4 de monocotiledóneas), con 10 ó más repeticiones dinucleotídicas, encontraron que el motivo más repetido fue el AT (74%), seguido por las repeticiones AG/TC (24%) y AC/TG (1%), mientras que las del tipo CG no fueron encontradas en lo absoluto. Estos autores también comprobaron que las repeticiones trinucleotídicas eran menos frecuentes en plantas (10%) que las dinucleotídicas. A su vez, Wu *et al.* (2012) determinaron que en nogal Persa las repeticiones más frecuentes eran de dinucleótidos, aunque en un menor porcentaje (48,1%) que las reportadas por Morgante y Olivieri (1993), seguidas por las tetra (30,0%) y trinucleotídicas (29,1%), siendo el motivo más abundante el AT. Lo que confirma que

era más lógico crear bibliotecas enriquecidas con motivos formados por 2 nucleótidos para el diseño de los microsatélites *de novo*. Al igual que para el híbrido maderero, Woeste *et al.* (2002) también crearon genotecas preferentemente enriquecidas en regiones SSR de los dinucleótidos (GA/CT) para el nogal negro americano.

A partir de los más de 700 clones secuenciados, fueron prediseñados un total de 360 parejas de cebadores, las que fueron sometidas a un laborioso proceso de optimización que rindió un total de 24 *loci* microsatélites. Estos fueron probados en una muestra de 50 árboles plus, arrojando muy buenos resultados, al menos mucho mejores que con los marcadores WGA, lo que se tradujo en una buena capacidad de discriminación. Woeste *et al.* (2002) partieron de un total de 1500 colonias secuenciadas, rindiendo un número similar de clones a los encontrados en el híbrido maderero, que contenían regiones SSR (450), para culminar finalmente con 141 parejas, de las que solo 30 demostraron ser lo suficientemente polimórficas en la población objeto de estudio.

Una selección de 8 de las nuevas parejas diseñadas, junto con dos de la genoteca WGA fueron evaluados en una muestra de 20 nogales híbridos Mj209xRa pero de una procedencia diferente al de la población objeto de estudio. Una vez concluida esta tarea se pudo comprobar que los microsatélites eran capaces de rendir buenos resultados en una muestra emparentada pero de origen diferente, lo que servía como referencia para hacer inferencias sobre la robustez del *set* de marcadores diseñado. Es por ello que no se descarta y se considera bastante factible que los marcadores SSR diseñados *de novo* podrían ser utilizados en diferentes estudios genéticos en las especies y géneros de la familia *Juglandaceae*.

Poniendo en perspectiva este trabajo, se podrían comparar los resultados alcanzados con el uso de marcadores microsatélites en humanos. Gill (2002) afirma que el CODIS, la base de datos del FBI, utiliza un total de 13 parejas de marcadores SSR, con los que se obtiene una probabilidad de emparejamiento entre dos individuos menor de 10^{-13} . Igualmente, sugiere que, partir de una probabilidad de 1 en 1 billón (1000 000 000 ó 10^{-9}) sería suficiente para trazar el perfil de ADN de una persona.

Los resultados aquí mostrados se encuentran a la altura de los alcanzados en poblaciones naturales o en sistemas de clasificación de variedades comerciales de nogal, aun trabajando con una población de una muy estrecha base genética. Por ejemplo, Dangl *et al.* (2005) reportaron valores de PID del orden de 10^{-11} en un estudio de caracterización en el que utilizaron 14 marcadores WGA en una muestra de 47 accesiones de *J. regia* procedentes de Afganistán, Alemania, China, EUA, España, Francia, Hungría y Reino Unido. Por su parte, Chen *et al.* (2014), empleando un total de

12 *loci* de una genoteca diferente a la anterior, obtuvieron una PID conjunta de $0,75 \cdot 10^{-12}$, al genotipar 35 variedades de nogal para fruta ampliamente cultivados en China. A pesar de que los valores de PIDs alcanzadas con los marcadores diseñados específicamente para el nogal híbrido maderero son menores que los reportados por Robichaud *et al.* (2006) con el análisis de 12 *loci*, éstos resultaron ser más que suficientes para diferenciar árboles por su perfil genético con una muy baja probabilidad de error.

5. CONCLUSIONES

5. Conclusiones

El análisis de los resultados antes presentados ha permitido arribar a una serie de conclusiones generales, que se resumen a continuación.

1. La micropropagación del nogal híbrido maderero estuvo determinada por la combinación del manejo de factores biológicos, químicos, físicos y ambientales. Todas las fases de la micropropagación estuvieron condicionadas mayormente por el genotipo.
2. Fue posible desarrollar un protocolo de desinfección *in vitro* a partir material contaminado. El mero hecho de seleccionar un antibiótico adecuado no fue garantía suficiente para el saneamiento. El proceso de descontaminación dependió de la selección de la combinación de varios factores, además del tipo de agente desinfectante. Partir de una fuente de explante con una baja incidencia de agentes microbianos fue la base para alcanzar el control de la contaminación. La aplicación de un tratamiento crónico, que ejerció un efecto inicial bacteriostático, contribuyó al control paulatino de los agentes microbianos y finalmente condujo al saneamiento del material contaminado. La inoculación de partes del explante en un medio de crecimiento microbiano fue la única prueba fiable que sirvió para certificar el control de la contaminación.
3. La inducción de un segundo rejuvenecimiento del material de partida para la introducción, mejoró la capacidad de establecimiento *in vitro* de un mayor número de genotipos. Aunque la contaminación microbiana continuó siendo una fuente importante de pérdidas de material, la reducción de los efectos de la emisión de sustancias fenólicas al medio de cultivo, precisamente por la utilización de material más juvenil, constituyó un factor de éxito para los resultados alcanzados.
4. La definición de un criterio para considerar qué es un explante de calidad, enraizable y con potencialidad para sobrevivir durante la aclimatación constituyó la base sobre la cual se diseñó el presente protocolo.
5. El manejo de la edad del microbrote y de la relación medio de cultivo-densidad de inóculo contribuyó a obtener material de calidad para el inicio del enraizamiento.
6. La sustitución del FeEDTA por FeEDDHA no sólo condujo a la corrección de la clorosis presente en los cultivos, sino que contribuyó a mejorar el crecimiento y desarrollo de los microbrotes, así como la rizogénesis y la supervivencia de las vitroplantas.
7. La introducción del Floroglucinol en el medio de cultivo y el manejo de diferentes concentraciones durante las diversas fases de la micropropagación fueron elementos claves para el desarrollo del presente protocolo. La utilización de 0,4 mM durante la proliferación mejoró el crecimiento de los explantes, mientras que reducir

- la concentración a 0,2 mM durante la fase previa al inicio del enraizamiento, además de garantizar la producción de microbrotes de calidad, incrementó su capacidad rizogénica y redujo la mortalidad en la fase *ex vitro*.
8. Existió una interacción estadística entre la concentración de sacarosa y el genotipo durante la pre-inducción radical. Obviando las particularidades, se consideró conveniente el uso de 117 mM de sacarosa durante esta fase.
 9. El enraizamiento y la supervivencia estuvieron modulados por el tipo de fuente de carbono utilizada durante la expresión radical, siendo la glucosa (83,2 mM) la que mejores resultados globales rindió.
 10. La falta de interacción entre el genotipo y el resto de las fuentes de variación evaluadas contribuyó a definir un protocolo funcional que podría conducir al escalado comercial de la producción de clones selectos de nogal híbrido maderero. En consecuencia, el protocolo de micropropagación aquí presentado ha permitido producir cerca de 10 000 vitroplantas de hasta 14 genotipos diferentes.
 11. De los 10 marcadores SSR de la genoteca confeccionada a partir de *J. nigra* (Woeste *et al.* 2002), sólo 8 rindieron productos de amplificación interpretables; sin embargo su poder discriminativo conjunto fue muy bajo.
 12. El desarrollo de un set de microsatélites *de novo*, específico para el nogal híbrido maderero, ha permitido contar con una herramienta de clasificación genética para genotipar dentro de una población con un elevado grado de parentesco.
 13. Esta batería de marcadores podrían constituir una alternativa para la realización de estudios genéticos dentro de la familia *Juglandaceae*.

6. REFERENCIAS

6. Referencias

- Adams PD, Kloepper JW (2002) Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant and Soil*. 240 (1): 181-189
- Aggarwal D, Kumar A, Reddy MS (2010) Shoot organogenesis in elite clones of *Eucalyptus tereticornis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 102: 45-52. DOI 10.1007/s11240-010-9703-y
- Ahmed N, Mir JI, Rouf Mir R, Ahmad Rather N, Rashid R, Wani SH, Shafi W, Mir H, Sheikh MA (2012) SSR and RAPD analysis of genetic diversity in walnut (*Juglans regia* L.) genotypes from Jammu and Kashmir, India. *Physiol Mol Biol Plants*. DOI 10.1007/s12298-012-0104-z
- Ainsley PJ, Collins GG, Sedgley M (2001) *In vitro* rooting of almond (*Prunus dulcis* Mill.). *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 37: 778–785
- Alderman DR, Brinberg D, Wiedenbeck J (2010) Forestry Practices and Veneer Log Value—Manufacturer's Assessments of Veneer Log Attributes. *Forest Science*. 56 (2): 193-200
- Aletà N (2004) Current Research in Spain on Walnut for Wood Production. En: Black Walnut in a New Century. Proceedings of the 6th Walnut Council Research Symposium. July 25-28; Lafayette, EUA. Michler CH, Pijut PM, Van Sambeek JW, Coggeshall MV, Seifert J, Woeste K, Overton R, Ponder FJr (Eds). Gen. Tech. Rep. NC-243. St. Paul, MN: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, North Central Research Station: 153-155
- Aletà N, Ninot A, Voltas J (2004) Retrospective evaluation of parental selection in nursery tests of *Juglans regia* L. using a mixed model analysis. *Silvae Genetica*. 53 (1): 26-32
- Aletà N, Vilanova A (2006) El nogal híbrido. *Navarra Forestal*. 13: 18-21
- Aletà N, Vilanova A, Piqué M, Coello J (2008) Frondoses nobles: Materials vegetals i tècniques de maneig per a la producció de fusta de qualitat. XXV Jornades Tècniques Silvícoles. JM Tusell and P Vericat (Eds.). Santa Coloma de Farners, Consorci Forestal de Catalunya: 55-63
- Aletà N, Vilanova A (2011) Criterios Orientadores para la Admisión de Materiales de Base del Género *Juglans*. Requisitos Técnicos. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino: 1-39
- Amiri ME, Gharati S (2012) Influence of medium composition on multiplication of walnut (*Juglans regia* L.) growth. *J Med Plants Res*. 6 (8): 1482-1485

- Aradhya MK, Potter D, Simon CJ (2004) Origin, evolution, and biogeography of *Juglans*: a phylogenetic perspective. En: Vth International Walnut Symposium. ME Malvoti y D Avanzato (Eds.) Acta Horticulturae. 705: 85-94
- Aradhya MK, Potter D, Gao F, Simon CJ (2007). Molecular phylogeny of *Juglans* (*Juglandaceae*): a biogeographic perspective. Tree Genetics & Genomes. 3 (4): 363-378. DOI 10.1007/s11295-006-0078-5
- Arulsekhar S, Parfitt DE, McGranahan GH (1985) Isozyme gene markers in *Juglans* species Inheritance of GPI and AAT in *J. regia* and *J. hindsii*. Journal of Heredity. 76 (2): 103-106
- Ashrafi EN, Vahdati K, Ebrahimzadeh, H, Mirmasoumi M (2010) Analysis of *in vitro* explants mineral contents to modify medium mineral composition for enhancing growth of Persian walnut (*Juglans regia* L.). J Food Agric Environ. 8: 325–329
- Baumgartner K, Fujiyoshi P, Browne GT, Leslie C, Kluepfel DA (2013) Evaluating paradox walnut rootstocks for resistance to armillaria root disease. HortScience. 48 (1): 68-72
- Beineke WF (1974) Inheritance of several traits in black walnut clones. Department of Forestry and Conservation, Ag. Exp. Stn., Purdue Univ., Stn. Bull., West Lafayette, IN. 38:12
- Beineke WF, Stelzer HE, Fisher GA (1991) Genetic Variation and Heritability Estimates in Black Walnut Clones at Different Ages. Proceedings of the Indiana Academy of Science. 99: 137-140
- Belaj A, Satovic Z, Cipriani G, Baldoni L, Testolin R, Rallo L, Trujillo I (2003) Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. Theoretical and Applied Genetics. 107 (4): 736-744
- Benson E (2000) *In vitro* Plant Recalcitrance: An Introduction. Special Symposium: *In vitro* Plant Recalcitrance. *In vitro* Cell. Dev. Biol.—Plant. 36: 141–148
- Bey CF, Williams RD (1975) Black walnut trees of southern origin growing well in Indiana. En: Proceedings of the Indiana Academy of Science. 84: 122-128
- Bisbis B, Kevers C, Crevecoeur M, Dommes J, Gaspar T (2003) Restart of lignification in micropropagated walnut shoots coincides with rooting induction. Biologia Plantarum. 47 (1): 1-5
- Blackburn D, Hamilton M, Harwood C, Innes T, Potts B, Williams D (2010) Stiffness and checking of *Eucalyptus nitens* sawn boards: genetic variation and potential for genetic improvement. Tree Genetics & Genomes. 6 (5): 757-765
- Blanke MM, Belcher AR (1989) Stomata of apple leaves cultured *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 19 (1): 85-89

- Bonal D, Monteuiis O (1997) *Ex vitro* survival, rooting and initial development of *in vitro* rooted vs unrooted microshoots from juvenile and mature *Tectona grandis* genotypes. *Silvae Genetica*. 46 (5): 301-306
- Bonga JM, Von Aderkas P (1992) *In vitro* culture of trees. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp 1-232
- Borisjuk L, Walenta S, Weber H, Müller-Kleiser, Wobus U (1998) High-resolution histographical mapping of glucose concentration in developing cotyledons of *Vicia faba* in relation to mitotic activity and storage process: glucose as a possible developmental trigger. *Plant J*. 15: 583-591
- Bosela MJ, Michler CH (2008) Media effects on black walnut (*Juglans nigra* L.) shoot culture growth *in vitro*: evaluation of multiple nutrient formulations and cytokinin types. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 44 (4): 316-329
- Bosela M (2009) Effects of b-lactam antibiotics, auxins, and cytokinins on shoot regeneration from callus cultures of two hybrid aspens, *Populus tremuloides* x *P. tremula* and *P. x canescens* x *P. gradidentata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 98: 249–261. DOI 10.1007/s11240-009-9555-5
- Brainerd KE, Fuchigami LH (1982) Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, mannitol, ABA, and CO₂. *Journal of Experimental Botany*. 33 (3): 388-392
- Brito G, Santos C (2009) Basal medium improvement for routine micropropagation of *Olea maderensis*: physiological comparative studies. *Can. J. For. Res* 39: 814-822
- Britton MT, Leslie CH, McGranahan GH, Dandekar AM (2007) Walnuts. En: *Transgenic Crops V*. EC Pua y MR Davey (Eds). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. 60: 349-370
- Caboni E, Damiano C (2004) *In vitro* propagation of walnut (*Juglans regia* L.): critical factors for the induction of the rooting response. *Acta Hort*. 705: 329-333. DOI: 10.17660/ActaHortic.2005.705.44
- Campbell MM, Sederoff RR (1996) Variation in Lignin Content and Composition (Mechanisms of Control and Implications for the Genetic Improvement of Plants). *Plant Physiology*. 110 (1): 3-13
- Capellades M, Fontarnau R, Carulla C, Debergh P (1990) Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 115 (1): 141-145
- Celestino C, Fernandez-Guijarro B, Hernández I, Lopez-Vela D, Carneros E, Jimenez J, Cardo L, Alegre J, Toribio M (2009) Growth data from a field trial of *Quercus suber* plants regenerated from selected trees and from their half-sib progenies by somatic embryogenesis. *Acta Hort*. 812: 493-498

- Chaney RL, Giordano PM (1977) Microelements as related to plant deficiencies and toxicities. En: Soils for the management of organic wastes and waste waters. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI. LF Elliot & FJ Stevenson (Eds.): 235-279
- Chen L, Ma Q, Chen Y, Wang B, Pei D (2014) Identification of major walnut cultivars grown in China based on nut phenotypes and SSR markers. *Scientia Horticulturae*. 168: 240-248
- Chenevard D, Jay-Allemand C, Gendraud M, Frossard JS (1995) The effect of sucrose on the development of hybrid walnut microcuttings (*Juglans nigra* x *Juglans regia*). Consequences on their survival during acclimatization. En: *Annales des Sciences Forestières*. 52 (2): 147-156
- Chenevard D, Frossard JS, Jay-Allemand C (1997) Carbohydrate reserves and CO₂ balance of hybrid walnut (*Juglans nigra* no. 23 X *Juglans regia*) plantlets during acclimatisation. *Scientia Horticulturae*. 68 (1): 207-217
- Cheniany M, Ebrahimzadeh H, Masoudi-nejad A (2012) Expression of chalcone synthase influences flavonoid content and frequency of rhizogenesis in microshoots of *Juglans regia* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 109 (1): 51-59
- Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu JK (2005) Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*. 45 (2): 437-448
- Ciarmiello LF, Piccirillo P, Pontecorvo G, De Luca A, Kafantaris I, Woodrow P (2011) A PCR based SNPs marker for specific characterization of English walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Molecular Biology Reports*. 38(2): 1237-1249
- Cipriani G, Spadotto A, Jurman I, Di Gaspero G, Crespan M, Meneghetti S, Frare E, Vignani R, Cresti M, Morgante M, Pezzotti, M, Pe E, Policriti A, Testolin R (2010) The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin. *Theoretical and Applied Genetics*. 121 (8): 1569-1585. DOI: 10.1007/s00122-010-1411-9
- Clark J, Hemery G (2010) Walnut hybrids in the UK: fast growing quality hardwoods. *Quarterly Journal of Forestry*. 104: 43-46
- Conn VM, Franco CM (2004) Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (3): 1787-1794

- Compton ME, Koch JM (2001) Influence of plant preservative mixture (PPM) TM on adventitious organogenesis in melon, petunia, and tobacco. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 37(2): 259-261
- Confalonieri M, Balestrazzi A, Bisoffi S, Carbonera D (2003) *In vitro* culture and genetic engineering of *Populus* spp.: synergy for forest tree improvement. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 72 (2): 109-138
- Cox M, Hogarth DM, Smith G (2000) Cane breeding and improvement. En: *Manual of Cane Growing*. Bureau of Sugar Experimental Stations. DM Hogarth y PG Allsopp (Eds.): 91-108
- Custódio L, Martins-Loução MA, Romano A (2004) Influence of sugars on *in vitro* rooting and acclimatization of carob tree. *Biologia Plantarum*. 48 (3): 469-472
- da Rocha Corrêa L, Paim DC, Schwambach J, Fett-Neto AG (2005) Carbohydrates as regulatory factors on the rooting of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Growth Regulation*. 45 (1): 63-73
- da Silva JAT, Dobránszki J, Ross S (2013) Phloroglucinol in plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant*. 49:1–16
- Dangl GS, Woeste K., Aradhya MK, Koehmstedt A, Simon C, Potter D, Leslie C, McGranahan G (2005) Characterization of 14 microsatellite markers for genetic analysis and cultivar identification of walnut. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 130 (3): 348-354
- Davis AS, Wilson BC, Jacobs and DF (2004) Effect of Seed Position and Media on Germination of Black Walnut and Northern Red Oak: Implication for Nursery Production and Direct Seeding. En: *Black Walnut in a New Century*. Proceedings of the 6th Walnut Council Research Symposium. July 25-28; Lafayette, EUA. Michler CH, Pijut PM, Van Sambeek JW, Coggeshall MV, Seifert J, Woeste K, Overton R, Ponder FJr (Eds.). Gen. Tech. Rep. NC-243. St. Paul, MN: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, North Central Research Station: 31-36
- Davis JM (2008) Genetic improvement of poplar (*Populus* spp.) as a bioenergy crop. En: *Genetic Improvement of Bioenergy Crops*. W Vermerris (Ed.). Springer Science+Business Media, New York: 397-419. DOI: 10.1007/978-0-387-70805 - 8_14
- Debergh PC, Read PE (1991) Micropropagation. En: *Micropropagation. Technology and Applications*. PC Debergh y RH Zimmermman (Eds.). Kluwer Academic Publishers. Springer, The Netherlands. pp 1-13
- de Klerk GJ, van der Krieken W, & de Jong JC (1999) Review the formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 35 (3): 189-199

- de Klerk GJ, Guan H, Huisman P, Marinova S (2011) Effects of phenolic compounds on adventitious root formation and oxidative decarboxilation of applied indolacetic acid in *Malus Jork 9*. *Plant Growth Regul.* 63: 175–185
- DeNise S, Johnston E, Halverson J, Marshall K, Rosenfeld D, McKenna S, Sharp T, Edwards J (2004) Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers. *Animal Genetics.* 35 (1): 14-17. DOI: 10.1046/j.1365-2052.2003.01074.x
- Díaz R, Fernández-López J (2005) Genetic variation at early ages for several traits of interest for timber-production breeding of *Juglans regia*. *Canadian Journal of Forest Research.* 35 (2): 235-243
- Doğan Y, Kafkas S, Sütyemez M, Akça Y, Türemis N (2014) Assessment and characterization of genetic relationships of walnut (*Juglans regia* L.) genotypes by three types of molecular markers. *Scientia Horticulturae.* 168: 81–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.01.024>
- Dolcet-Sanjuan R, Claveria E, Gruselle R, Meier-Dinkel A, Jay-Allemand C, Gaspar T (2004) Practical factors controlling *in vitro* adventitious root formation from walnut shoots microcuttings. *J Amer Soc Hort Sci.* 129:198-203
- Driver JA, Kuniyuki AH (1984) *In vitro* Propagation of Paradox Walnut Rootstock. *HortScience.* 19 (4): 507-509
- Đurković J, Kaňuchová A, Kačík F, Solár R, Langyelová A (2012) Genotype- and age-dependent patterns of lignin and cellulose in regenerants derived from 80-year-old tress of black mulberry (*Morus nigra* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 108: 359-370. DOI 10.1007/s11240-011-0047-z
- Ebrahimi A, Fatahi R, Zamani Z (2011) Analysis of genetic diversity among some Persian walnut genotypes (*Juglans regia* L.) using morphological traits and SSRs markers. *Scientia Horticulturae* 130: 146–151. DOI:10.1016/j.scienta.2011.06.028
- Eurostat (2015) Sawnwood trade by species. <http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do>
- Evenson RE, Gollin D (2003) Assessing the impact of the Green Revolution, 1960 to 2000. *Science.* 300 (5620): 758-762.
- Fady B, Ducci F, Aletà N, Becquey J, Vazquez RD, Fernandez Lopez FF, Jay-Allemand C, Lefevre F, Ninot A, Panetsos K, Paris P, Pisanelli A, Rumpf H (2003) Walnut demonstrates strong genetic variability for adaptive and wood quality traits in a network of juvenile field tests across Europe. *New Forests.* 25 (3): 211-225
- FAO (2010) Evaluación de los recursos forestales mundiales 2010. Informe principal. Estudio FAO: Montes. 163: 1-346

- FAO (2014) Forest Products Statistics. 2013 Global Forest Products Facts and Figures. Food and Agriculture Organization of the United Nations: 1-15. <http://www.fao.org/forestry/35445-0e287e9c252335f2936d3cdc5b6bbd5ff.pdf>
- Fjellstrom RG, Parfitt DE (1994) RFLP inheritance and linkage in walnut. *Theoretical and Applied Genetics*. 89 (6): 665-670
- Fjellstrom RG, Parfitt DE (1995) Phylogenetic analysis and evolution of the genus *Juglans* (*Juglandaceae*) as determined from nuclear genome RFLPs. *Plant Systematics and Evolution*. 197 (1-4): 19-32
- Froni I, Rao R, Woeste K, Gallitelli M (2005) Characterisation of *Juglans regia* L. with SSR markers and evaluation of genetic relationships among cultivars and the 'Sorrento' landrace. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 80 (1): 49-53
- Froni I, Rao R, Woeste K (2006) Molecular characterization of *Juglans regia* L. cultivars with SSR markers. En: Vth International Walnut Symposium. ME Malvoti y D Avanzato (Eds.) *Acta Horticulturae*. 705: 207-213
- Froni I, Woeste K, Monti LM, Rao R (2007). Identification of 'Sorrento' walnut using simple sequence repeats (SSRs). *Genetic Resources and Crop Evolution*. 54 (5): 1081-1094
- Frutos D (2010) Bacterial diseases of walnut and hazelnut and genetic resources. *Journal of Plant Pathology*. 92 (1): 79-85
- Fu Z, Xu P, He S, Teixeira da Silva JA, Tanaka M (2011) Dynamic changes in enzyme activities and phenolic content during *in vitro* rooting of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) plantlets. *Maejo Int. J. Sci. Technol*. 5 (02): 252-265
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 50: 151-158
- George EF^(a) (1993) Plant Propagation by Tissue Culture. Parte 1. The Technology. 2^{da} Edición. Exegetics Limited. pp 1-574
- George EF^(b) (1993) Plant Propagation by Tissue Culture. Parte 2. In Practice. 2^{da} Edición. Exegetics Limited. pp 575-1361
- George L, Eapen S, Rao PS (1993) Enhanced plant regeneration in pearl millet (*Pennisetum americanum*) by ethylene inhibitors and cefotaxime. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 32 (1): 91-96
- George MW, Tripepi RR (2001) Plant Preservative Mixture™ can affect shoot regeneration from leaf explants of Chrysanthemum, European birch, and Rhododendron. *HortScience*. 36 (4): 768-769
- Gibson SI (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 8:93–102. DOI 10.1016/j.pbi.2004.11.003

- Gill P (2002) Role of short tandem repeat DNA in forensic casework in the UK-past, present, and future perspectives. *Biotechniques*. 32 (2): 366-385
- Gil-Ortiz R, Bautista-Carrascosa I (2004) Effects of Fe-EDDHA chelate application on evolution of soil extractable iron, copper, manganese, and zinc. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 35 (3-4): 559-570. DOI: 10.1081/CSS-120029732
- Glenn TC y Schable NA (2005) Isolating microsatellite ADN *loci*. *Methods in Enzymology*. 395: 202-222
- Goh DKS, Japarudin Y, Alwi A, Lapammu M, Flori A, Monteuuis O (2013) Growth differences and genetic parameter estimates of 15 teak (*Tectona grandis* L.) genotypes of various ages clonally propagated by microcuttings and planted under humid tropical conditions. *Silvae Genetica*. 62: 4-5
- González R, López-López MJ, Biosca EG, López F, Santiago R, López MM (2002) First report of bacterial deep bark canker of walnut caused by *Brenneria* (*Erwinia*) *rubrifaciens* in Europe. *Plant Disease*. 86 (6): 696-696. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.6.696B>
- Groutel E, Alix Y (2015) Le Temps du Bois. Note Estrategique and Prospective. Éditions Management & Societe: 1-79
- Gruselle R, Boxus P (1990) Walnut Micropropagation. *Acta Hortic*. 284: 45-52. DOI: 10.17660/ActaHortic.1990.284.3
- Guàrdia M, Díaz R, Save R, Aletà N (2013) Autumn frost resistance on several walnut species: methods comparison and impact of leaf fall. *Forest Science*. 59 (5): 559-565. <http://dx.doi.org/10.5849/forsci.12-094>
- Günes T (1999) An investigation on rooting of *Juglans regia* L. hardwood cuttings. *Tr. J. of Botany*. 23: 367-372
- Gupta RK, Verma VS (2011) Quality Planting Material Production through Efficient and Low Cost Micro Propagation Protocol in Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Vegetos-An International Journal of Plant Research*. 24 (1): 96-102
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee, WF, Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*. 43 (10): 895-914
- Hamilton M, Joyce K, Williams D, Dutkowski G, Potts B (2008) Achievements in forest tree improvement in Australia and New Zealand 9. Genetic improvement of *Eucalyptus nitens* in Australia. *Australian Forestry*. 71 (2): 82-93
- Hasey J, Grant J, Lampinen B, Metcalf S (2005) Growth and performance of own-rooted 'Chandler' and 'Vina' compared to Paradox rooted trees. *Walnut Research Reports*: 73-79. http://info.ucanr.org/fnwalnuts/walnut_proc/2005/2005_73.pdf

- Hatzilazarou SP, Syros TD, Yupsanis TA, Bosabalidis AM, Economou AS (2006) Peroxidases, lignin and anatomy during *in vitro* and *ex vitro* rooting of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) microshoots. *Journal of Plant Physiology*. 163: 827-836. DOI 10.1016/j.jplph.2005.06.018
- Hemery GE (2004) Genetic and Silvicultural Research Promoting Common Walnut (*Juglans regia*) for Timber Production in the United Kingdom. En: Black Walnut in a New Century. Proceedings of the 6th Walnut Council Research Symposium. July 25-28; Lafayette, EUA. Michler CH, Pijut PM, Van Sambeek JW, Coggeshall MV, Seifert J, Woeste K, Overton R, Ponder F Jr (Eds.). Gen. Tech. Rep. NC-243. St. Paul, MN: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, North Central Research Station: 138-145
- Holford P, Newbury HJ (1992) The effects of antibiotics and their breakdown products on the *in vitro* growth of *Antirrhinum majus*. *Plant Cell Reports*. 11 (2): 93-96
- Holten KB, Onusko EM (2000) Appropriate Prescribing of Oral Beta-Lactam Antibiotics. *Am. Fam. Physician*. 62(3): 611-620
- Jacobs DF, Davis AS (2005) Genetic considerations in the operational production of hardwood nursery stock in the eastern United States. *Native Plants Journal*. 6 (1): 4-13
- Jay-Allemand C, Capelli P, Cornu D (1992) Root development of *in vitro* hybrid walnut microcuttings in a vermiculite-containing gelrite medium. *Sci Hort*. 51:335-342
- Jay-Allemand C, Fady B, Becquey J (1996) Walnut Trees for Woodland Use in Mediterranean Countries: Current Situation and Prospects. *FAO Nucis Newsletter*. 5. December: 10-13
- Jenks MA, Ashworth EN (1999) Plant epicuticular waxes: function, production, and genetics. *Horticultural Reviews*. 23: 1-68
- Jimenez VM, Castillo J, Tavares E, Guevara E, Montiel M (2006) *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 86: 389-385. DOI 10.1007/s11240-006-9120-4
- Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Winfield MO, Sala F, Van de Wiel C, Bredemeijer G, Vosman B, Matthes M, Daly A, Brettschneider R, Bettini P, Buiatti M, Maestri E, Malcevschi A, Marmiroli N, Aert R, Volckaert G, Rueda J, Linacero R, Vazquez A, Karp A (1997) Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*. 3 (5): 381-390
- Juárez M, Bermúdez D, Jordá JD, Sánchez-Andreu J, Cerdáan MM (2001) Effect of copper, nickel, zinc, and phosphorus on reactions of FeEDDHA and FeEDDHMA

- isomers under variable pH. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 32 (3-4): 509-519
- Karimi R, Ershadi A, Vahdati K, Woeste K (2010) Molecular Characterization of Persian Walnut Populations in Iran with Microsatellite Markers. *HortScience*. 45 (9): 1403–1406
- Keskitalo M, Pohto A, Savela ML, Valkonen JPT, Simon J, Pehu E (1998) Alterations in growth of tissue-cultured tansy (*Tanacetum vulgare* L.) treated with antibiotics. *Annals of Applied Biology*. 133 (2): 281-296
- Khush GS (2001) Green revolution: the way forward. *Nature Reviews Genetics*. 2 (10): 815-822. DOI:10.1038/35093585
- Kumar V, Gururaj HB, Narasimha Prasad BC, Giridhar P, Ravishankar GA (2005) Direct shoot organogenesis on shoot apex from seedling explants of *Capsicum annuum* L. *Sci Hort*. 106:237–246
- Leahey RRB, Newton AC (1993) Domestication of 'Cinderella' species as the start of a woody-plant revolution. En: *Tropical Trees: the potential for domestication and the rebuilding of forest resources*. RRB Leahey y AC Newton (Eds.) The Proceedings of a Conference Organized by the Edinburgh Centre for Tropical Forests, held at Heriot-Watt University Edinburgh, 23-28 August 1992: 3-7
- Leifert C, Cassells AC (2001) Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 37: 133-138
- Leslie CA, Hackett WP, Bujazha D, Hirbod S, McGranahan GH (2005) Adventitious rooting and clonal plant production of hybrid walnut (*Juglans*) rootstock selections. *Acta Hort*. 705:325–328
- Leslie CA, Hackett WP, Bujazha D, Hirbod S, McGranahan GH (2006) Adventitious rooting and clonal plant production of hybrid walnut (*Juglans*) rootstock selections. *Proceeding of Vth International Walnut Symposium*. ME Malvolti and D Avanzato (Eds.). *Acta Horticulturae*. 705: 325-328
- Leslie CA, McGranahan GH (2004) Persian Walnut Breeding in California. En: *Black Walnut in a New Century*. *Proceedings of the 6th Walnut Council Research Symposium*. July 25-28; Lafayette, EUA. Michler CH, Pijut PM, Van Sambeek JW, Coggeshall MV, Seifert J, Woeste K, Overton R, Ponder FJr (Eds.). *Gen. Tech. Rep. NC-243*. St. Paul, MN: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, North Central Research Station: 25-30
- Lloyd G, McCown B (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society*. 30: 421–427

- López JM (1999) Field behaviour of self-rooted walnut trees of different cultivars produced by tissue culture and planted in Murcia (Spain). *Acta Horticulturae*. 544: 543-546
- López JM (2001) Field behaviour of self-rooted walnut trees of different cultivars produced by tissue culture and planted in Murcia (Spain). *Act. Hort.* 544: 543-546. DOI: 10.17660/ActaHortic.2001.544.76
- Macdonald E, Mochan S, Connolly T (2000) Protocol for Stem Straightness Assessment in Sitka Spruce. Information Note. Forestry Commission. 39:1-56. <http://www.forestry.gov.uk>
- Mahmoodi R, Rahmani F, Rezaee R (2013) Genetic diversity among *Juglans regia* L. genotypes assessed by morphological traits and microsatellite markers. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 11 (2): 431-437. <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2013112-3445>
- Manning WE (1978) The classification within the *Juglandaceae*. *Annals of Missouri Botanical Garden*. 65: 1058-1087.
- Manos PS, Stone DE (2001) Evolution, phylogeny and systematics of the *Juglandaceae*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 88: 231–269
- Marín JA, Gella R, Herrero M (1988) Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L. *Annals of Botany*. 62 (6): 663-670
- Marino SR, Williamson JG, Olmstead JW, Harmon PF (2014) Vegetative Growth of Three Southern Highbush Blueberry Cultivars Obtained from Micropropagation and Softwood Cuttings in Two Florida Locations. *HortScience*. 49 (5): 556-561
- Marino G, Gaggia F, Baffoni L, Toniolo C, Nicoletti M (2015) Antimicrobial activity of *Melia azedarach* fruit extracts for control of bacteria in inoculated in-vitro shoots of 'MRS 2/5' plum hybrid and calla lily and extract influence on the shoot cultures. *European Journal of Plant Pathology*. 141 (3): 505-521
- Marshall TC, Slate JBKE, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7 (5): 639-655
- Masson A, Julien JM, Boedt L (2013) Industrial propagation by rooted cuttings of mature selected clones of *Hevea brasiliensis*. *Bois et Forêts des Tropiques*. 317 (3): 51-58
- McCown BH (2000) *In vitro* plant recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: Dealing with genetic predeterminism. Special Symposium. *In vitro* Plant Recalcitrance. *In vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant. 36 (3): 149-154

- McClellan AE, Sudarshana P, Kluepfel DA (2008) Enhanced detection and isolation of the walnut pathogen *Brenneria rubrifaciens*, causal agent of deep bark canker. *European Journal of Plant Pathology*. 122(3): 413-424
- McGranahan GH, Driver JA, Tulecke W (1987) Tissue culture of *Juglans*. En: *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Vol. 3. Case Histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms. Bonga JM y Durzan DJ (Eds.). Martinus Nijhoff Publishers: 261-271
- McGranahan G, Leslie CA (1988) *In vitro* Propagation of Mature Persian Walnut Cultivars. *HortScience*. 23 (1): 220
- McGranahan G, Hackett WP, Lampinen BD, Leslie C, Bujazha D, Hirbod S (2006) Clonal propagation of walnut rootstock genotypes for genetic improvement. *Walnut Research Report*. 71. http://ucanr.edu/repositoryfiles/2005_85_ocr.pdf-154389.pdf
- McGranahan G, Leslie C (2009) Breeding walnuts (*Juglans regia*). En: *Breeding plantation tree crops: temperate species*. S. Mohan Jain y P. M. Priyadarshan (Eds.). Springer New York: 249-273
- McGregor CE, Lambert CA, Greyling MM, Louw JH, Warnich L (2000) A comparative assessment of ADN fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica*. 113 (2): 135-144
- Ménard M, Delort F, Baudry A, Le Saux M (2004) First report of bacterial canker of walnut caused by *Brenneria nigrifluens* in France. *Plant Disease*. 88 (2): 220-220. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.2.220B>
- Merlo Sanchez E, Santaclara Estevez O, Urban Martinez I (2013) Crecimiento, forma y calidad de madera en clones de cerezo y nogal. Estudio clonal y ambiental y uso de métodos no destructivos para su evaluación. En: 6to Congreso Forestal Español. Sociedad Española de Ciencias Forestales (Ed.). Vitoria-Gasteiz, 10 a 14 de Junio: 2-13
- Michler CH, Pijut PM, Jacobs DF, Meilan R, Woeste KE, Ostry ME (2006) Improving disease resistance of butternut (*Juglans cinerea*), a threatened fine hardwood: a case for single-tree selection through genetic improvement and deployment. *Tree Physiology*. 26 (1): 121-128
- Michler CH, Woeste KE, Pijut PM (2007) Black walnut. En: *Forest Trees. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. Springer Berlin Heidelberg. 7: 189-198
- Miyazaki J, Tan BH, Errington SG, Kuo JJS (2011) Bacterial endophyte in *Macropidia fuliginosa*: its localisation and eradication from *in vitro* cultured basal-stem callus. *Australian Journal of Botany*. 59 (4): 363-368
- Morgante M, Olivieri AM (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*. 3 (1): 175-182

- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15 (3): 473-497
- Nas MN, Read PE (2001) Micropropagation of hybrid hazelnut: medium composition, physical state and iron source affect shoot morphogenesis, multiplication and explant vitality. *Acta Hort*. 556: 251–258
- Navatel JC, Bourrain L (2001) Plant production of walnut *Juglans regia* L. by *in vitro* multiplication. IV International Walnut Symposium. *Acta Horticulturae*. 544: 465-471
- Niedz RP (1998) Using isothiazolone biocides to control microbial and fungal contaminants in plant tissue cultures. *HortTechnology*. 8 (4): 598-601
- Orlikowska T, Zawadzka M, Zenkteler E, Sobiczewski P (2012) Influence of the biocides PPM (TM) and Vitrofur on bacteria isolated from contaminated plant tissue cultures and on plant microshoots grown on various media. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 87(3): 223-230
- Ouma JP, Young MM, Reichert NA (2004) Rooting of *in vitro* regenerated cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is influenced by genotype, medium composition, explant type and age. *African Journal of Biotechnology*. 3 (6): 313-318
- Paetkau D (2003) An empirical exploration of data quality in DNA-based population inventories. *Molecular Ecology*. 12 (6):1375-1387
- Paris P, Ducci F, Brugnoli E, De Rogatis A, Fady B, Malvolti ME, Olimpieri G, Pisanelli A, Proietti R, Scartazza A, Cannata F (2001) Primi risultati di prove comparative d'accessioni europee di noce da legno. En: *Atti del III Congresso Nazionale SISEF "Alberi e Foreste per il Nuovo Millennio"*, Viterbo: 15-18
- Pawlicki N, Welander M (1995) Influence of carbohydrate source, auxin concentration and time of exposure on adventitious rooting of the apple rootstock Jork 9. *Plant Science*. 106:167-176
- Peraza Sánchez F, Arriaga Martitegui F, Guindeo Casasús A, García Esteban L, Kasner Camacho C, Medina Gallego G, de Palacios de Palacios P, Touza Vázquez M (2004) Especies de madera para carpintería, construcción y mobiliario. Asociación de Investigación Técnica de Industrias de la Madera y Corcho (AITIM): 1-883
- Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Valentão P, Andrade PB, Ferreira IC, Ferreres F, Bento A, Seabra R, Estevinho L (2007) Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology*. 45 (11): 2287-2295. DOI:10.1016/j.fct.2007.06.004
- Pereira J ES, Fortes GRL (2003) Toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* da batata em meios semi-sólido e líquido. *Pesq. Agropec. Bras*. 38 (11): 1273-1279

- Pérez-Tornero O, Lopez JM, Garcia Montiel F, Burgos L (2006) Field Performance Differences in Three Apricot Cultivars Propagated by Tissue Culture or by Grafting. *Acta Hortic.* 717: 255-260. DOI: 10.17660/ActaHortic.2006.717.53
- Phelps JE, McGinnes EA, Garrett HE, Cox GS (2007) Growth-quality evaluation of black walnut wood. Part II-Color analyses of veneer produced on different sites. *Wood and Fiber Science.* 15 (2): 177-185
- Piccirillo P (2003) The phytopathological situation of walnuts (*Juglans regia* L.) according to observations made by the Fruit Research Institute of Caserta. *Rivista di Frutticoltura e Ortofloricoltura.* 65 (10): 39-43
- Pijut PM (1997) Micropropagation of *Juglans cinerea* L. (butternut). In: High-Tech and Micropropagation VYPS Bajaj (Ed.). Springer Berlin Heidelberg Biotechnology in Agriculture and Forestry. 39: 345-357
- Pijut PM, Moore M J (2002) Early season softwood cuttings effective for vegetative propagation of *Juglans cinerea*. *HortScience.* 37 (4): 697-700
- Pizaña MYA (2013) Efecto de la disminución gradual de la humedad relativa en la densidad estomatal y actividad de la ATPasa en células guarda de *Physalis peruviana*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Yautepec de Zaragoza, Morelos, México. pp 1-74. <http://tesis.bnct.ipn.mx:8080/dspace/bitstream/123456789/12827/1/Tesis%20Miran%20Yazmin%20Angeles%20Piza%C3%B1a.pdf>
- Pollegioni P, Woeste K, Major A, Scarasciamugnozza G, Malvolti ME (2009) Characterization of *Juglans nigra* (L.), *Juglans regia* (L.) and *Juglans x intermedia* (Carr.) by SSR markers: a case study in Italy. *Silvae Genetica.* 58 (1-2): 69-78
- Popović T, Ivanović Ž, Živković S, Trkulja N, Ignjatov M (2013) First Report of *Brenneria nigrifluens* as the Causal Agent of Shallow-Bark Canker on Walnut Trees (*Juglans regia*) in Serbia. *Plant Disease.* 97 (11): 1504-1504
- Rajput SG, Wable KJ, Sharma KM, Kubde PD, Mulay SA (2006) Reproducibility testing of RAPD and SSR markers in tomato. *African Journal of Biotechnology.* 5 (2): 108-112
- Reed BM, Buckley PM, Dewilde TN (1995) Detection and Eradication of Endophytic Bacteria from Micropropagated Mint Plants. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant.* 31 (1): 53-57
- Reid W, Coggeshall MV, Hunt KL (2004) Cultivar Evaluation and Development for Black Walnut Orchards. En: Black Walnut in a New Century. Proceedings of the 6th Walnut Council Research Symposium. July 25-28; Lafayette, EUA. Michler CH, Pijut PM, Van Sambeek JW, Coggeshall MV, Seifert J, Woeste K, Overton R,

- Ponder FJr (Eds.). Gen. Tech. Rep. NC-243. St. Paul, MN: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, North Central Research Station: 18-24
- Reis E, Batista MT, Canhoto JM (2008) Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg. Protoplasma. 232:193–202
- Revilla MA, Majada J, Rodriguez R (1989) Walnut (*Juglans regia* L.) micropropagation. In: Annales des Sciences Forestières. Forest Tree Physiology. E. Dreyer *et al.* (Eds.). 46: 149s-151s
- Rink G, Clausen KE (1989) Site and age effects on genotypic control of juvenile *Juglans nigra* L. tree height. Silvae Genetica. 37: 210-213
- Rink G (1990) *Juglans cinerea* L. Butternut. En: Silvics of North America. Volume 2. Hardwoods. RM Burns y BH Honkala (Coords.). Forest Service of the United States Department of Agriculture. Agriculture Handbooks. 654: 386-390
- Ripetti V, Kevers C, Gaspar T (1994) Two successive media for the rooting of walnut shoots *in vitro*. Changes in peroxidase activity and in ethylene production. Advances in Horticultural Science. 8: 29-32
- Ripoll MA, Sánchez-Miranda A, Gallego E, Jiménez MN, Navarro FB, Gálvez C, Licea R, Homar CA, Santa Cruz D, Urbán I (2014) Brotación, supervivencia y crecimiento inicial de 8 clones de nogal seleccionados para la producción de madera de calidad en terrenos agrícolas de la Vega de Granada. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Informe Científico-Técnico: 1-11.
<http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/servifapa/contenidoAlf?id=fc7bf562-5832-4a65-a4be-8748937fe63f>
- Robichaud RL, Glaubitz JC, Rhodes OE, Woeste K (2006) A robust set of black walnut microsatellites for parentage and clonal identification. New Forest 32: 179-196. DOI 10.1007/s11056-005-5961-7
- Rodriguez R, Revilla A, Albuerne M, Perez C (1989) Walnut (*Juglans* spp.). En: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Tress II. YPS Bajaj (Ed.). Springer Berlin Heidelberg. 5: 99-126
- Romano A, Noronha C, Martins-Loucao MA (1995) Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 40 (2): 159-167
- Rosenblueth M, Martínez-Romero E (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Molecular Plant-Microbe Interactions. 19 (8): 827-837

- Ross-Davis A, Woeste K (2008) Microsatellite markers for *Juglans cinerea* L. and their utility in other *Juglandaceae* species. *Conservation Genetics*. 9 (2): 465-469. DOI 10.1007/s10592-007-9337-8
- Rowntree JK (2006) Development of novel methods for the initiation of *in vitro* bryophyte cultures for conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 87(2): 191-201
- Ruiz-Garcia L, Lopez-Ortega G, Fuentes Denia A, Frutos Tomas D (2011) Identification of a walnut (*Juglans regia* L.) germplasm collection and evaluation of their genetic variability by microsatellite markers. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 9 (1), 179-192
- Russell K, Hemery GE (2004) A New Tree Improvement ProGrame for Black Walnut in the United Kingdom. En: *Black Walnut in a New Century*. Proceedings of the 6th Walnut Council Research Symposium. July 25-28; Lafayette, EUA. Michler CH, Pijut PM, Van Sambeek JW, Coggeshall MV, Seifert J, Woeste K, Overton R, Ponder FJr (Eds.). Gen. Tech. Rep. NC-243. St. Paul, MN: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, North Central Research Station: 134-137
- Rustaei M, Nazeri S, Ghadimzadeh, M, Hemmaty, S (2009) Effect of Phloroglucinol, medium type and some component on *in vitro* proliferation of Dwarf root stock of apple (*Mallus domestica*). *International Journal Agriculture & Biology*. 11 (2): 0-0
- Saadat YA, Hennerty MJ (2002) Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). *Scientia Horticulturae*. 95 (3): 251-260. DOI:10.1016/S0304-4238(02)00003-1
- Saini N, Jain N, Jain S, Jain RK (2004) Assessment of genetic diversity within and among Basmati and non-Basmati rice varieties using AFLP, ISSR and SSR markers. *Euphytica*. 140 (3): 133-146
- Sanchez MC, San-Jose MC, Ballester A, Vieitez AM (1996) Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. *Tree Physiology*. 16 (8): 673-680
- Sánchez-Olate M, Sáez P, Ríos D (2009) Rhizogenic induction in adult *Juglans regia* L. cv. Serr tissue induced by Indole Butyric acid and *Agrobacterium rhizogenes*. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 69 (2): 286-291
- Santos Macedo E, Sircar D, Cardoso HG, Peixe A, Arnholdt-Schmitt B (2012) Involvement of alternative oxidase (AOX) in adventitious rooting of *Olea europea* L. microshoots is linked to adaptive phenylpropanoid and lignin metabolism. *Plant Cell Report*. 31: 1581-590. DOI 10.1007/s00299-012-1272-6
- Sarkar D, Naik PS (2000) Phloroglucinol enhances growth and rate of axillary shoot proliferation in potato shoot tip cultures *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 60: 139–149

- Scaltsoyiannes A, Tsoulpha P, Panetsos KP, Moulalis D (1997) Effect of genotype on micropropagation of walnut trees (*Juglans regia*). *Silvae Genetica*. 46 (6): 326-331
- Sharifian S, Vahdati K, Mirmasoumi M, Maghami SA (2009) Assessment of phloroglucinol effect on rooting of tissue cultured Persian walnut. *Acta Horticulturae*. 812: 189-195
- Shibli RA, Mohammad MJ, Ajlouni ZI (2002) Growth and micronutrient acquisition of *in vitro* grown bitter almond and sour orange in response to iron concentration from different iron chelates. *Journal of Plant Nutrition*. 25 (7): 1599-1606
- Siwach P, Rani Gill A (2011) Enhanced shoot multiplication in *Ficus religiosa* L. in the presence of adenine sulphate, glutamine and phloroglucinol. *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 17 (3): 271–280. DOI 10.1007/s12298-011-0074-6
- Smith JSC, Chin ECL, Shu H, Smith OS, Wall SJ, Senior ML, Mitchell SE, Kresovich S, Ziegler J (1997) An evaluation of the utility of SSR *loci* as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theoretical and Applied Genetics*. 95 (1-2): 163-173
- Smith MAL, McClelland MT, Timmermann R (1991) Anomalous root structure on woody plants *in vitro*. *Journal of Environmental Horticulture* 9 (2): 61-64
- Solar A, Colarič M, Usenik V, Stampar F (2006) Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Science*. 170 (3): 453-461. DOI:10.1016/j.plantsci.2005.09.012
- Sotiropoulos TE, Almaliotis D, Papadakis I, Dimassi KN, Therios IN (2006) Effects of different Iron Sources and Concentrations on *In Vitro* Multiplication, Rooting and Nutritional Status of the Pear Rootstock 'OHF 333'. *European Journal of Horticultural Science*. 71 (5): 222-226
- Stampar F, Solar A, Hudina M, Veberic R, Colaric M (2006) Traditional walnut liqueur–cocktail of phenolics. *Food Chemistry*. 95 (4): 627-631. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.01.035
- Strauss SH, Lande R, Namkoong G (1992) Limitations of molecular-marker-aided selection in forest tree breeding. *Canadian Journal of Forest Research*. 22 (7): 1050-1061
- Takahashi F, Sato-Nara K, Kobayashi K, Suzuki M, Suzuki H (2003) Sugar-induced adventitious roots in *Arabidopsis* seedlings. *J Plant Res*. 116:83–91. DOI 10.1007/s10265-002-0074-2
- Tang W, Newton RJ (2003) Genetic transformation of conifers and its application in forest biotechnology. *Plant Cell Reports*. 22 (1): 1-15

- Tardieu F, Tuberosa R (2010) Dissection and modelling of abiotic stress tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 13 (2): 206-212. DOI: 10.1016/j.pbi.2009.12.012
- Teixeira J, Antonio L (2011) Agronomic Performance of 'Prata-Ana Banana Regarding to Plant Propagation Method. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 33 (1): 89-95
- Tetsumura T, Tsukuda K, Kawase K (2002) Micropropagation of Shinano walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 71 (5): 661-663
- Thomas P (2004) *In vitro* decline in plant cultures: detection of a legion of covert bacteria as the cause for degeneration of long-term micropropagated triploid watermelon cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 77: 173-179
- Thomas P, Prakash GS (2004) Sanitizing long-term micropropagated grapes from covert and endophytic bacteria and preliminary field testing of plants after 8 years *in vitro*. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 40 (6): 603-607
- Topcu H, Coban N, Woeste K, Sutyemez M, Kafkas S (2015) Developing new microsatellite markers in walnut (*Juglans regia* L.) from *Juglans nigra* genomic GA enriched library. *Ekin Journal of Crop Breeding and Genetics*. 1-2: 93-99
- Unterseher M (2011) Diversity of Fungal Endophytes in Temperate Forest Trees. En: *Endophytes of Forest Trees: Biology and Applications*. AM Pirttilä y AC Frank (Eds.). Springer, Netherlands. *Forestry Sciences*. 80: 31-46. DOI 10.1007/978-94-007-1599-8 2
- Vahdati K, Leslie C, Zamani Z, McGranahan G (2004) Rooting and acclimatization of *in vitro*-grown shoots from mature trees of three Persian walnut cultivars. *HortScience*. 39 (2): 324-327
- Van der Salm TPM, Van der Toorn CJG, Hänish Ten Cate CH, Dubois LAM, De Vries DP, Dons HJM (1994) Importance of the iron chelate formula for micropropagation of *Rosa hybrida* L. "Moneyway". *Plant Cell Tissue & Organ Culture*. 37: 73-77
- Végh A, Tóth A, Zámbo Á, Borsos G, Palkovics L (2014) First Report of Bacterial Bark Canker of Walnut Caused by *Brenneria nigrifluens* in Hungary. *Plant Disease*. 98 (7): 988-988
- Victory ER, Woeste KE, Rhodes OE (2004) History of Black Walnut Genetics Research in North America. En: *Black Walnut in a New Century*. Proceedings of the 6th Walnut Council Research Symposium. July 25-28; Lafayette, EUA. Michler CH, Pijut PM, Van Sambeek JW, Coggeshall MV, Seifert J, Woeste K, Overton R, Ponder FJr (Eds.). Gen. Tech. Rep. NC-243. St. Paul, MN: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, North Central Research Station: 1-8

- Victory ER, Glaubitz JC, Rhodes OE, Woeste KE (2006) Genetic homogeneity in *Juglans nigra* (Juglandaceae) at nuclear microsatellites. *Am. J. Bot.* 93:118–126
- Vieitez AM, Pintos F, San-José MC, Ballester A (1993) *In vitro* shoot proliferation determined by explant orientation of juvenile and mature *Quercus rubra* L. *Tree Physiology*. 12: 107-117
- Vilanova Subirats A, Turu DG, Soler NA (2011) Evaluación del crecimiento y de la producción de madera en plantaciones españolas de nogal realizadas con progenies híbridas. Resultados en fase semiadulta. *Navarra Forestal*. 28: 12-19
- Vinocur B, Altman A (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*. 16 (2): 123-132. DOI 10.1016/j.copbio.2005.02.001
- Vuylsteke D, Ortiz R, Shaun R, Ferris B, Crouch JH (1997) Plantain Improvement. En: *Plant Breeding Reviews*. J Janick (Ed.). John Wiley & Sons, Inc.14: 267-320
- Wagner HW, Sefc KM (1999) IDENTITY 1.0. Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences, Vienna
- Waits LP, Luikart G, Taberlet P (2001) Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*. 10 (1): 249-256
- Wang H, Pei D, Gu R, Wang B (2008) Genetic Diversity and Structure of Walnut Populations in Central and Southwestern China Revealed by Microsatellite Marker. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133 (2): 197–203
- Weber H, Heim U, Golombek S, Borisjuk L, Manteuffel R, Wobus U (1998) Expression of a yeast-derived invertase in developing cotyledons of *Vicia narbonensis* alters carbohydrate state and affects storage functions. *Plant J* 16: 163-172
- White PR (1963) *The Cultivation of Animal and Plant Cells*. 2nd Edition. Ronald Press, New York: 228
- Wiedenbeck J, Wiemann M, Alderman D, Baumgras J, Luppold W (2004) Defining Hardwood Veneer Log Quality Attributes. Gen. Tech. Rep. NE-313. Newtown Square, PA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Northeastern Research Station: 1-36
- Wiesner I, Wiesnerova D (2009) Sequence characterized markers for flax seed authentication. *Seed Science and Technology*. 37 (1): 206-213
- Williams RD (1990) *Juglans nigra* L. Black Walnut. En: *Silvics of North America*. Volume 2. Hardwoods. RM Burns y BH Honkala (Coords.). Forest Service of the United States Department of Agriculture. Agriculture Handbooks. 654: 391-399
- Williams ER, Matheson AC, Harwood CE (2002) Experimental design and analysis for tree improvement. Segunda Edición. CSIRO, Australia: 1-220

- Woeste KE (2002) Heartwood production in a 35-year-old black walnut progeny test. Canadian Journal of Forest Research. 32 (1): 177-181
- Woeste KE, McGranahan GH, Bernatzky R (1996) Randomly amplified polymorphic ADN *loci* from a walnut backcross [(*Juglans hindsii* × *J. regia*) × *J. regia*]. Journal of the American Society for Horticultural Science. 121(3): 358-361
- Woeste KE, Burns R, Rhodes O, Michler C (2002) Thirty Polymorphic Nuclear Microsatellite *Loci* from Black Walnut. The Journal of Heredity. 93 (1): 58-60
- Woeste KE, McKenna JR (2004) Walnut Genetic Improvement at the Start of a New Century. En: Black Walnut in a New Century. Proceedings of the 6th Walnut Council Research Symposium. July 25-28; Lafayette, EUA. Michler CH, Pijut PM, Van Sambeek JW, Coggeshall MV, Seifert J, Woeste K, Overton R, Ponder FJR (Eds.). Gen. Tech. Rep. NC-243. St. Paul, MN: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, North Central Research Station: 9-17
- Woods JG, Paetkau D, Lewis D, McLellan BN, Proctor M, Strobeck C (1999) Genetic tagging of free-ranging black and brown bears. Wildlife Society Bulletin. 27 (3): 616-627
- Wu HX, Eldridge KG, Matheson AC, Powell MB, McRae TA, Butcher TB, Johnson IG (2007) Achievements in forest tree improvement in Australia and New Zealand 8. Successful introduction and breeding of radiata pine in Australia. Australian Forestry. 70 (4): 215-225
- Wu J, Gu YQ, Hu Y, You FM, Dandekar AM, Leslie CA, Aradhya M, Dvorak J, Luo MC (2012) Characterizing the walnut genome through analyses of BAC end sequences. Plant Molecular Biology. 78 (1-2): 95-107
- Yrjälä K, Mancano G, Fortelius C, Akerman ML, Sipilä TP (2010) The incidence of *Burkholderia* in epiphytic and endophytic bacterial cenoses in hybrid aspen grown on sandy peat. Boreal Environment Research. 15 (1): 81-96
- Yeats TH, Buda GJ, Wang Z, Chehanovsky N, Moyle LC, Jetter R, Schaffer AA, Rose JK (2012) The fruit cuticles of wild tomato species exhibit architectural and chemical diversity, providing a new model for studying the evolution of cuticle function. The Plant Journal. 69 (4): 655-666. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04820.x
- Yousefikopaei F, Tagliavi SM, Banihashemi Z (2007) Occurrence of Shallow Bark Canker of Walnut (*Juglans regia*) in Southern Provinces of Iran. Pakistan Journal of Biological Sciences. 10 (9): 1507-1512
- Yu TA, Yeh SD, Yang JS (2001) Effects of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. Botanical Bulletin of Academia Sinica. 42:281-286

- Zhao P, Woeste KE (2011) ADN markers identify hybrids between butternut (*Juglans cinerea* L.) and Japanese walnut (*Juglans ailantifolia* Carr.). *Tree Genetics & Genomes*. 7(3): 511-533
- Zimmerman RH (1984) Rooting apple cultivars *in vitro*: Interactions among light, temperature, phloroglucinol and auxin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 3: 301-311