

Conservación de germoplasma de árboles singulares de Galicia por cultivo *in vitro*

Germplasm conservation of singular trees of Galicia by *in vitro* culture

Sánchez C. *, Covelo P., Aldrey A., Vielba J., Rico S., Vidal N.

Departamento de Fisiología Vegetal, Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC.

Avda. de Vigo s/n. Apdo 122. 15780 Santiago de Compostela, A Coruña.

*Autor para correspondencia: conchi@iiag.csic.es

Resumen

El cultivo *in vitro* es una herramienta útil para la conservación y la propagación de germoplasma valioso, como es el caso de los árboles singulares. Además de lograr la clonación de sus genotipos y permitir su conservación a medio y largo plazo, presenta otras ventajas como la disponibilidad de material vegetal en cualquier momento del año para realizar estudios fisiológicos, genéticos y epigenéticos, y para ser utilizado en eventos de divulgación científica en centros educativos, ferias de la ciencia, etc. Por otra parte, la micropropagación de ejemplares de edad avanzada, como es el caso de los árboles singulares, puede resultar difícil debido a problemas como un número limitado de brotes disponibles para la instalación, altos niveles de microorganismos endógenos y exógenos, baja capacidad de multiplicación durante la prolongada etapa de estabilización y bajos porcentajes de formación de raíces. En este trabajo presentamos algunas actuaciones dirigidas a la instalación *in vitro* de ejemplares singulares de nogal, roble, alcornoque, abedul y eucalipto de Galicia, algunos de los cuales están recogidos en el "Catálogo de Árbores Senlleiras" de esta comunidad. En algunos de ellos se ha conseguido sobrepasar las fases de establecimiento y estabilización del cultivo y se están realizando ensayos de mantenimiento en frío, de enraizamiento y aclimatación en fitotrón e invernadero.

Summary

The *in vitro* culture is a useful tool for the conservation and propagation of valuable germplasm, as is the case of the singular trees. In addition to achieving the cloning of their genotypes and allowing their conservation in the medium and long term, has other advantages such as the availability of plant material at any time of the year to perform physiological, genetic and epigenetic studies, and to be used in scientific events in educational centers, science fairs, etc. On the other hand, the micropropagation of older individuals, as is the case of single trees, can be difficult due to problems such as a limited number of shoots available for installation, high levels of endogenous and exogenous microorganisms, low multiplication capacity during the prolonged stage of stabilization and low percentages of root formation. In this work we present some actions directed to the *in vitro* installation of singular specimens of walnut, oak, cork oak, birch and eucalyptus of Galicia, some of which are collected in the "Catálogo de Árbores Senlleiras" of this community. In some of them the establishment and stabilization phases of the crop have been surpassed and cold maintenance, rooting and acclimatization tests in phytotron and greenhouse are being carried out.

Palabras clave: clonación, crioconservación, enraizamiento, conservación *ex situ*, maduración, micropropagación

Keywords: cloning, cryopreservation, rooting, *ex situ* conservation, maturation, micropropagation

1. Introducción y objetivos

Los árboles singulares constituyen un patrimonio natural y cultural de gran valor y por tanto es necesario protegerlos en su propio entorno. Sin embargo, muchos de nuestros árboles singulares se encuentran en una situación de riesgo, bien por ser de edad avanzada y estar próximos al final de su ciclo de vida natural, o por vivir en enclaves donde están expuestos a peligros diversos, como plagas, enfermedades, incendios, etc. Por ejemplo, el nogal utilizado en este trabajo (*Fig. 1A*) ha sido derribado recientemente por la borrasca Qumaira (*Fig. 1B*), por lo que es posible que no le quede mucho tiempo de vida.

Además de su valor histórico y cultural, es de suponer que si los árboles singulares han alcanzado edades avanzadas, o si presentan portes fascinantes, puede deberse en parte a que poseen genotipos con un valor intrínseco que vale la pena conservar y estudiar, para lo cual puede ser útil el uso del cultivo *in vitro*.

El cultivo *in vitro* es un conjunto de técnicas que permiten, entre otras posibilidades, hacer propagación vegetativa basada en la pluripotencia de las células vegetales cuando la regeneración de plantas se obtiene mediante la vía organogénica, y en la totipotencia cuando sigue la vía embriogénica (Laimer y Rücker, 2012). Se caracteriza por utilizar explantos de pequeño tamaño que se cultivan en condiciones asépticas utilizando sales minerales, reguladores de crecimiento y otros compuestos orgánicos como azúcares y vitaminas (Hartmann *et al.*, 2011), de modo que los explantos se comportan metabólicamente como parcialmente heterótrofos.

El cultivo puede realizarse siguiendo 3 sistemas distintos: desarrollo de yemas axilares, inducción de yemas adventicias o inducción de embriones somáticos. En cualquiera de ellos existe una primera fase de establecimiento de un cultivo aséptico, seguido por un periodo de estabilización, que puede durar de unas semanas a varios meses, y que finaliza cuando los explantos alcanzan una tasa de multiplicación constante (Debergh y Read, 1991). A partir de este momento, en la fase de multiplicación, el número de explantos que se puede obtener al cabo de cada ciclo de subcultivo (entre 4 y 8 semanas por término medio) crece en progresión geométrica, lo cual permite obtener muchas copias idénticas del genotipo clonado de forma indefinida, y constituye una de las principales ventajas de este tipo de propagación.

La siguiente fase consiste en la obtención de una planta entera. Se habla de fase de enraizamiento para los brotes obtenidos por el desarrollo de yemas axilares o por la inducción de yemas adventicias, y de fase de germinación para los embriones somáticos que se multiplican por embriogénesis secundaria o repetitiva. El enraizamiento puede ser espontáneo en algunas especies vegetales, pero en el caso de los árboles adultos es muy frecuente que haya que proceder a la inducción de raíces por medio de tratamiento con auxinas. En el caso de los embriones somáticos, para que germinen es necesario que alcancen previamente un estado de maduración adecuado. Una vez obtenida una planta entera, se transfiere a tierra en la denominada fase de aclimatación, en la que debe adaptarse paulatinamente al metabolismo autótrofo y a las condiciones ambientales de invernadero y campo.

Además de la disponibilidad de gran número de propágulos genéticamente idénticos a la planta inicial, que ya se ha mencionado anteriormente, el cultivo *in vitro* presenta otras ventajas que pueden ser útiles en relación a los árboles singulares.

Una de ellas es la posibilidad de conservación *ex situ* de su material vegetal en pequeños espacios en condiciones controladas, bien a medio plazo, por ralentización del crecimiento mediante el almacenamiento en frío (4-6 °C), o a largo plazo mediante crioconservación en nitrógeno líquido de ápices caulinares o de embriones somáticos.

Además, el poder disponer de material vegetal en cualquier época del año permite abordar estudios fisiológicos, genéticos y epigenéticos de interés sin tener que recurrir al árbol original. Por otra parte, los cultivos de los distintos ejemplares pueden utilizarse como material de divulgación en eventos dirigidos a diferentes sectores sociales. Las plantas aclimatadas obtenidas podrían usarse en huertos de demostración, arboretos, e incluso para repoblaciones o plantaciones para producción de madera o fruto.

Por tanto, y con el objetivo de conservar y estudiar con mayor profundidad algunos de estos árboles sobresalientes, hemos abordado la propagación *in vitro* de algunos ejemplares singulares de la comunidad gallega. En algunos casos pertenecen al *Catálogo de Árbores Senlleiras de Galicia*, mientras que otros árboles están recogidos como singulares o monumentales por diversas asociaciones o redes sociales.

2. Material y métodos

2.1. Material vegetal

Como material vegetal se seleccionaron los árboles que se presentan en la *Figura 1*: un nogal (*Juglans regia*) de Licín (O Saviñao), con el n.º 122A del *Catálogo Galego de Árbores Senlleiras de Galicia* y edad estimada de 500 años (*Fig. 1A, B*); un alcornoque (*Quercus suber*) de Silleda, con el n.º 138A del *Catálogo Galego de Árbores Senlleiras de Galicia* y edad estimada de 500 años (*Fig. 1C, D*); otros 3 ejemplares de *Quercus suber* de la cuenca río Arnego (Agolada), calificada como ZEC (Zona Especial de Conservación) en la Red Natura, con edades estimadas entre 100 y 200 años (*Fig 1. E-G*); 3 ejemplares de roble común (*Quercus robur*) de Lalín, uno de ellos con n.º 131A del *Catálogo de Árbores Senlleiras de Galicia* y una edad estimada de 300 años (*Fig. 1H*), y otros 2 pertenecientes a la red “*Monumental trees*”, con n.º de catálogo 17859 (*Fig. 1I*) y 17797 (*Fig. 1J*) y cuya edad no ha sido establecida por el momento; un ejemplar de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) de Lalín, perteneciente a la red “*Monumental trees*”, con n.º de catálogo 17619 y con al menos 120 años de edad (*Fig. 1K*), y un ejemplar de abedul, posiblemente *Betula pubescens* cv celtibérica, perteneciente a la red “*Monumental trees*” con n.º de catálogo 17602 (*Fig. 1L*).

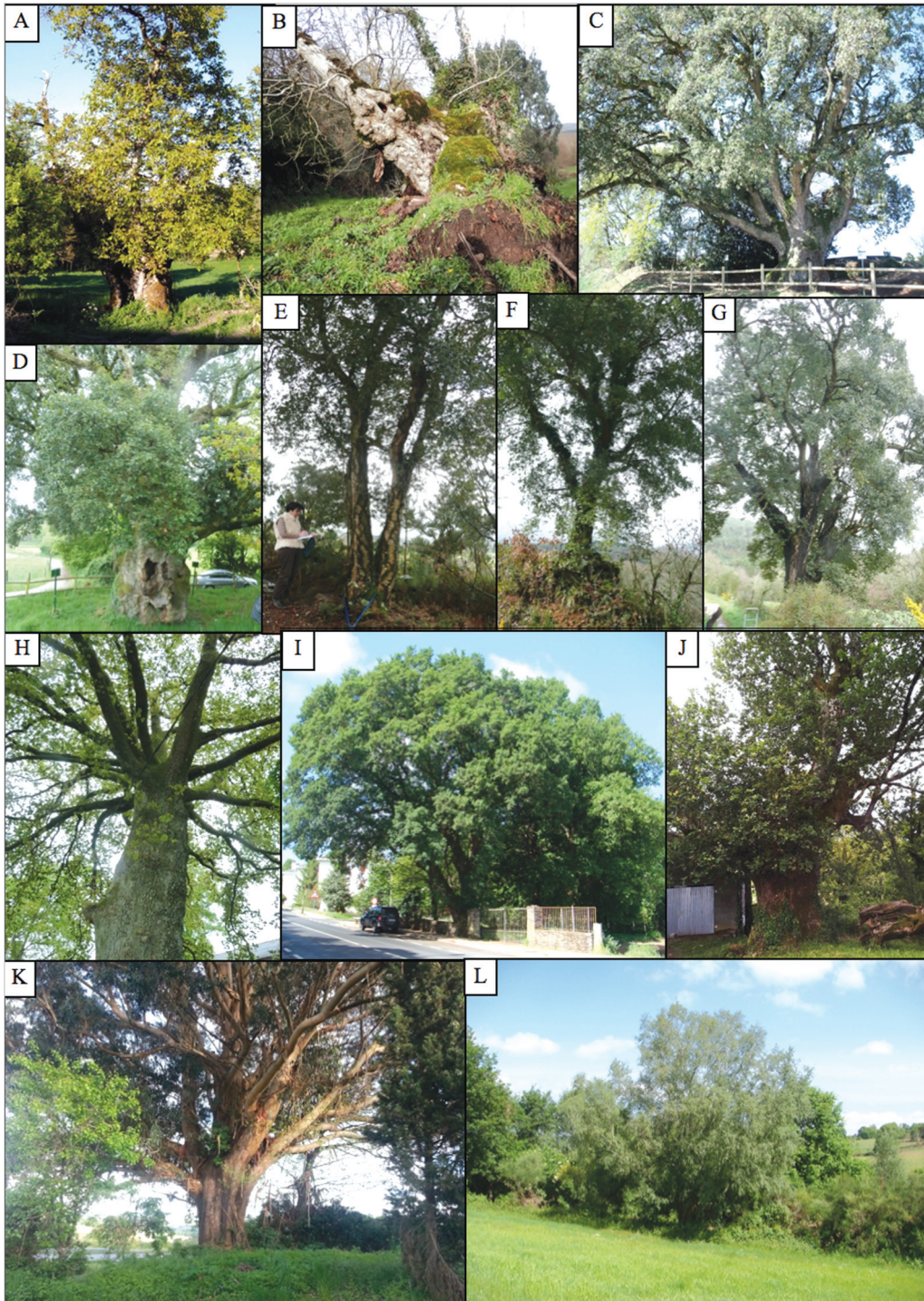


Figura 1. Árboles seleccionados para su instalación in vitro. A y B) Nogal de Licín (n.º 122A antes (A) y después (B) de ser derribado por la borrasca Qumaira a principios de 2014. C y D) *Quercus suber* de Silleda, con el n.º 138A del *Catálogo de Árbores Senlleiras de Galicia*. E-G) Ejemplares de *Quercus suber* recogidos en la cuenca río Arnego. H-J) Ejemplares de *Quercus robur* de Lalín, con n.º 131A del *Catálogo Galego de Árbores Senlleiras de Galicia* (H) y n.º de catálogo 17859 (I) y 17797 (J) de la red “*Monumental trees*”. K) *Eucalyptus globulus* de Lalín, n.º de catálogo 17619 de la red “*Monumental trees*”. L) Ejemplar de abedul de Lalín, n.º de catálogo 17602 de la red “*Monumental trees*”.

2.2. Metodología

2.2.1. Establecimiento de cultivos asépticos y cultivo en medio semisólido

Para el establecimiento *in vitro* del material vegetal se recogieron ramas con yemas en reposo al final del invierno o en crecimiento activo durante la primavera. En el caso de yemas en reposo se forzó su brotación en fitotrón, tras un tratamiento con fungicida y diferentes periodos de almacenamiento en frío. En el caso de los brotes recogidos en primavera se procedió directamente a su esterilización y establecimiento *in vitro*. Los brotes fueron esterilizados superficialmente siguiendo el protocolo descrito en Sanchez y Vieitez (1991), mediante un baño de 30 s con etanol al 70% y un baño de 10 min con hipoclorito sódico (6 g L^{-1}) de cloro activo, seguidos de 2 baños de 10 min en agua estéril. En el caso del material recogido directamente del árbol se incrementó a 20 min el tiempo del baño en hipoclorito. Las yemas fueron inoculadas inicialmente en tubos con medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con concentraciones variables de 6-benciladenina (BA) y ácido indol-3-butírico (AIB), 3% sacarosa y 0.65% agar Vitroagar (Pronadisa). El pH del medio se ajustó a 5.6-5.7 antes de su esterilización por autoclavado a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 min. Los cultivos se mantuvieron en cámaras de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas a $50\text{-}60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y 8 horas en oscuridad a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (condiciones estándar).

Los explantos que reaccionaron al establecimiento fueron propagados en los medios descritos en la bibliografía para su especie correspondiente. En el nogal se utilizó el medio DKW (Driver y Kuniyuki, 1984), en los alcornoques y robles varias formulaciones basadas en los medios MS y GD (Gresshoff y Doy, 1972) y en el caso del eucalipto y abedul también se utilizó el medio MS, con ligeras modificaciones. A todos los medios se les añadió 2-3% sacarosa y 0.65% agar. Para la inducción de embriones somáticos en hojas de alcornoque se siguió el protocolo descrito por Hernández *et al.* (2003).

Como reguladores de crecimiento se probaron diferentes concentraciones y tipos de citoquininas, auxinas y giberelinas. Se utilizaron contenedores de distintos tamaños, como tubos de vidrio de $15 \text{ cm} \times 2.5 \text{ cm}$, tarros de vidrio de 500 mL con tapa de cristal o en tarros de vidrio de 300 mL con tapa de plástico.

2.2.2. Cultivo en medio líquido

Alternativamente al medio gelificado con agar, algunos especímenes se cultivaron en medio líquido. En este caso se utilizaron biorreactores comerciales de 1L (RITA[®], Vitropic) (*Fig. 2A*), equipados con filtros de $0.2 \mu\text{m}$, y se emplearon los mismos medios que en cultivo semisólido pero sin agar. El sistema utilizado fue el de inmersión temporal, en el que el medio líquido es impulsado hasta el compartimento donde se encuentran los explantos por aire suministrado por una bomba a intervalos controlados (Sánchez *et al.*, 2013).

2.2.3. Almacenamiento en frío y crioconservación

Para el almacenamiento a medio plazo, los cultivos se mantuvieron en una cámara a 4-6 °C durante 1-2 años. Para el almacenamiento a largo plazo los explantos fueron crioconservados por vitrificación (Sakai *et al.*, 1990) siguiendo los protocolos descritos en Vidal *et al.* (2010) para alcornoque.

2.2.4. Enraizamiento y aclimatación

El enraizamiento fue inducido siguiendo los protocolos descritos por Sánchez *et al.* (1996). Básicamente, los brotes fueron tratados con 25 mg L⁻¹ de esta AIB durante 24 horas antes de pasar a medio sin reguladores de crecimiento. Los brotes enraizados de este modo y aquellos enraizados espontáneamente en el medio de multiplicación fueron transferidos a macetas en mezcla de turba:perlita (3:1) y aclimatados en fitotrón antes de su paso a invernadero.

3. Resultados y discusión

Las especies leñosas suelen ser recalcitrantes al cultivo *in vitro*. Esta característica es más evidente cuando se trata de ejemplares adultos, que presentan una drástica reducción de su potencial morfogénico con respecto a la fase juvenil (Bonga, 1982; Hackett, 1985). Esta falta de reactividad afecta a todas las fases del cultivo *in vitro*, pero resulta especialmente problemática durante el establecimiento y estabilización de los cultivos y posteriormente durante la fase de enraizamiento de los brotes obtenidos. Además, hay que tener en cuenta que cuanto mayor es el árbol del que se recoge el material vegetal, mayor es la probabilidad de que en su superficie o en su interior vivan diferentes tipos de microorganismos que van a dificultar la obtención de un cultivo aséptico.

Los árboles singulares aquí estudiados son especímenes de edad avanzada y como se podría esperar han presentado los problemas propios de su estado ontogénico. A pesar de que se logró establecer cultivos asépticos de los diez árboles seleccionados, no todos superaron la fase de estabilización. Así, los brotes de nogal (n.º 122A) mostraron una capacidad de brotación limitada a partir del material recogido en campo, pero se obtuvieron algunos brotes vigorosos (*Fig 2B*) a partir de los cuales se establecieron cultivos asépticos. Éstos mostraron un aspecto saludable durante las primeras semanas (*Fig 2C*), pero paulatinamente aparecieron síntomas de clorosis en las hojas y una disminución de la proliferación (*Fig 2D*), que llevó a la pérdida de los cultivos aproximadamente 4 meses después de su establecimiento. Los nogales son árboles particularmente recalcitrantes al cultivo *in vitro* y las dificultades para establecer genotipos concretos han sido citadas previamente (Licea Moreno 2016). Una situación similar ocurrió con los brotes del alcornoque n.º 138A, aunque en este caso los cultivos sobrevivieron durante algo más de un año (*Fig 2E*) antes de decaer. Además de la diferencia en el n.º de meses de su-

pervivencia entre los cultivos de ambos ejemplares, hay que señalar que el nogal se encuentra en una situación dramática debido a su derribo, durante los primeros meses de 2014, por el paso de la borrasca Qumaira (Fig 1B), lo que hace más urgente establecer medidas para la conservación de su material genético.

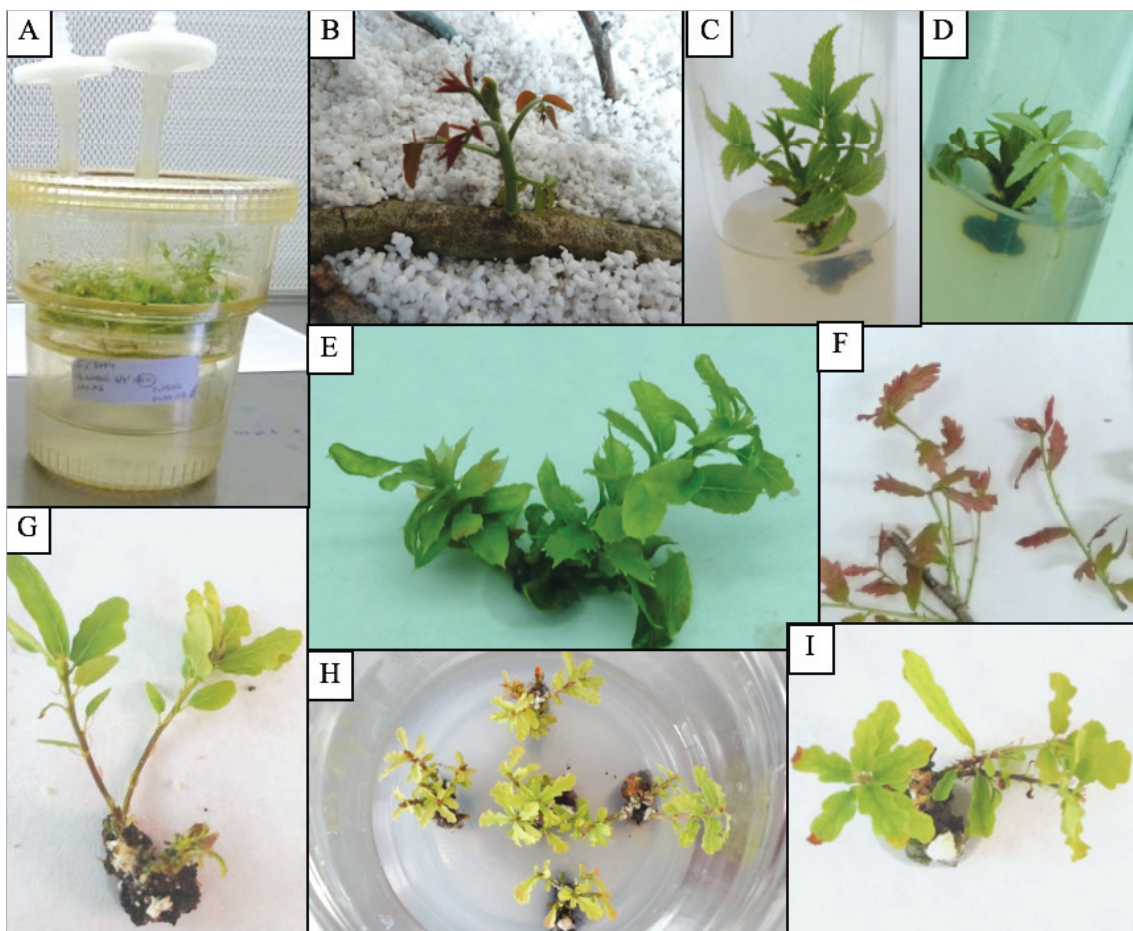


Figura 2. A) Recipiente RITA de inmersión temporal. B) Yema de nogal n.º 122A brotada en fitotrón. C) Brote de nogal en crecimiento activo. D) Brote de nogal con síntomas de clorosis. E) Brote de *Quercus suber* n.º 138A durante los primeros meses de su establecimiento in vitro. F) Brotes del *Quercus robur* n.º 131A recogidos en primavera para su instalación in vitro. G-I) Brotes de los robles 17797 (G), 131A (H) y 17859 (I) durante la fase de multiplicación.

En otros ejemplares, sin embargo, se han conseguido estabilizar cultivos que se encuentran actualmente en fase de multiplicación, como es el caso de los 3 genotipos de roble (Fig. 2F, G, H, I). Se están iniciando ensayos de enraizamiento en los diferentes clones, utilizando diferentes tratamientos hormonales y materiales de diferentes procedencias del árbol, con la finalidad de obtener plantas enraizadas y adecuar los protocolos en cuanto a concentración y tiempo de aplicación de la auxina para cada genotipo.

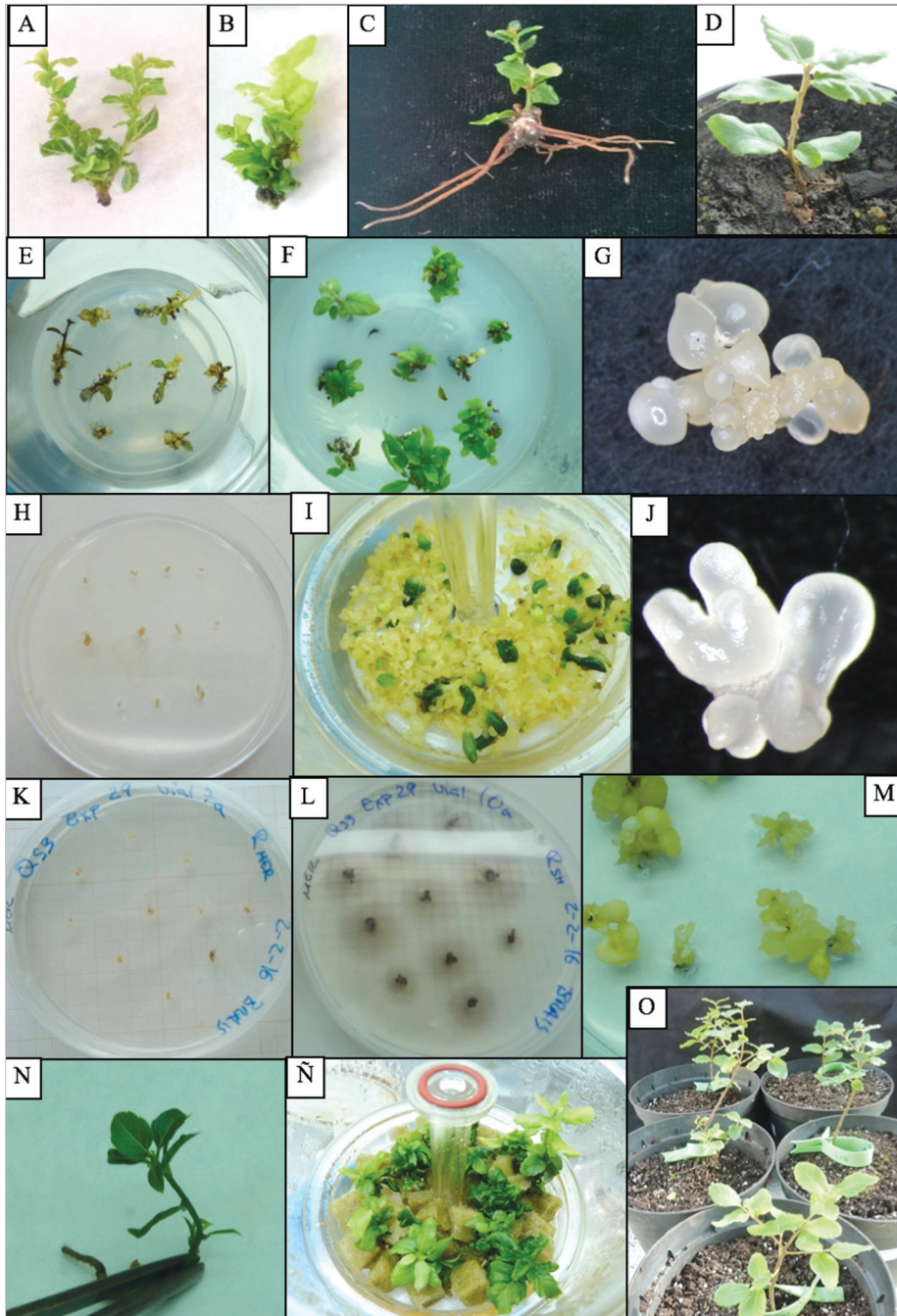


Figura 3. *Quercus suber* de la cuenca del río Arnego durante su cultivo *in vitro*. A y B) Brotes axilares de los genotipos Qs1 (A) y Qs3 (B) durante la fase de multiplicación. C) Brote enraizado de Qs3. D) Brote aclimatado de Qs3. E, F) Aspecto de los cultivos de Qs3 tras 2 años de almacenamiento en frío (E) y un mes después de su transferencia a medio de recuperación (F). G-I) Cultivos en proliferación de embriones somáticos de Qs3 (G). Aspecto de un cultivo en placa (H) y en RITA (I). J-M) Crioconservación de embriones somáticos de Qs3: explantos antes de su introducción en nitrógeno líquido (J), aspecto del cultivo tras 1 año en nitrógeno líquido y siembra en medio de recuperación (K), aspecto de los embriones 1 semana (L) y 6 semanas (M) después de la siembra en el medio de recuperación. N) Embrión somático de Qs3 germinado. Ñ) Cultivo en medio líquido de yemas axilares de Qs3 obtenidas a partir de un embrión germinado. O) Plantas de Qs3 seis meses después de su transferencia a invernadero.

Por otra parte, en 2 de los 3 los ejemplares de alcornoque recogidos en la cuenca del río Arnego se ha conseguido la multiplicación por yemas axilares (*Fig. 3A, B*), enraizamiento y aclimatación (*Fig. 3C, D*), así como almacenamiento en frío durante 2 años (*Fig. 3E, F*). Las tasas de enraizamiento oscilaron entre un 40 y un 70%, dependiendo del árbol, siendo mayor dicho porcentaje en el caso del material establecido a partir de brotes epicórmicos que en el establecido a partir de ramas bajas de la copa. Esto refleja las diferencias ontogénicas del material inicial, dado que los brotes epicórmicos originados a partir de yemas latentes en estado de reposo poseen un carácter más juvenil que el material de la copa, debido al gradiente de maduración que aumenta desde la base a la copa del árbol (Greenwood y Hutchinson, 1993; Bonga, 2010; Hartmann *et al.*, 2011), y coincide con lo observado en diferentes especies leñosas (Sanchez y Vieitez, 1991; Sanchez *et al.*, 1996; Ballester *et al.*, 1999). En uno de estos árboles (Qs3), cuyo material original procedía de brotes epicórmicos, también se han obtenido embriones somáticos (*Fig. 3G*) que se han cultivado en medio semisólido y en medio líquido (*Fig. 3H, I*) y que han sido sometidos con éxito a experimentos de crioconservación (*Fig. 3J, K, L, M*). Además, a partir de embriones somáticos germinados (*Fig. 3N*) se establecieron nuevos cultivos de yemas axilares que se propagaron también en medio líquido (*Fig. 3Ñ*) y que tras su enraizamiento fueron transferidos a invernadero y se encuentran actualmente en condiciones de campo (*Fig. 3O*).

En lo que respecta al eucalipto y al abedul, se ha conseguido también completar todas las fases del cultivo y se dispone de material enraizado y aclimatado (*Fig. 4A-H*) y se están iniciando los protocolos para almacenamiento a medio y largo plazo. Los brotes de abedul, a pesar de proceder de ramas de la copa, mostraron un elevado porcentaje de enraizamiento espontáneo (*Fig. 4C*) cuando se mantuvieron 8 semanas en el medio de multiplicación, debido a que es una especie de fácil enraizamiento, al igual que ocurre en el género *Populus* (Ahuja, 1993). Además, se aclimataron con facilidad (*Fig. 4D*). En eucalipto (*Fig. 4E*) se ensayaron diferentes tratamientos auxínicos para la inducción de raíces (*Fig. 4F, G*) y también se ha obtenido planta aclimatada (*Fig. 4H*). Los porcentajes de enraizamiento oscilan entre el 12 y el 55% dependiendo del tratamiento, lo que pone de manifiesto la relevancia de ajustar y optimizar dichos protocolos. La importancia del tratamiento auxínico (tipo de hormona, concentración, tiempo de aplicación, etc.), durante el enraizamiento adventicio de eucalipto ha sido también observado por otros autores (Fogaça y Fett-Neto, 2005).

4. Conclusiones

Se ha conseguido la conservación de germoplasma *in vitro* de ocho árboles singulares, tres robles, dos alcornoques, un eucalipto y un abedul, mediante la propagación de yemas axilares y/o embriogénesis somática. El material de alcornoque respondió exitosamente al cultivo en medio líquido y además los embriones somáticos se han crioconservado. Se desarrollaron protocolos eficien-

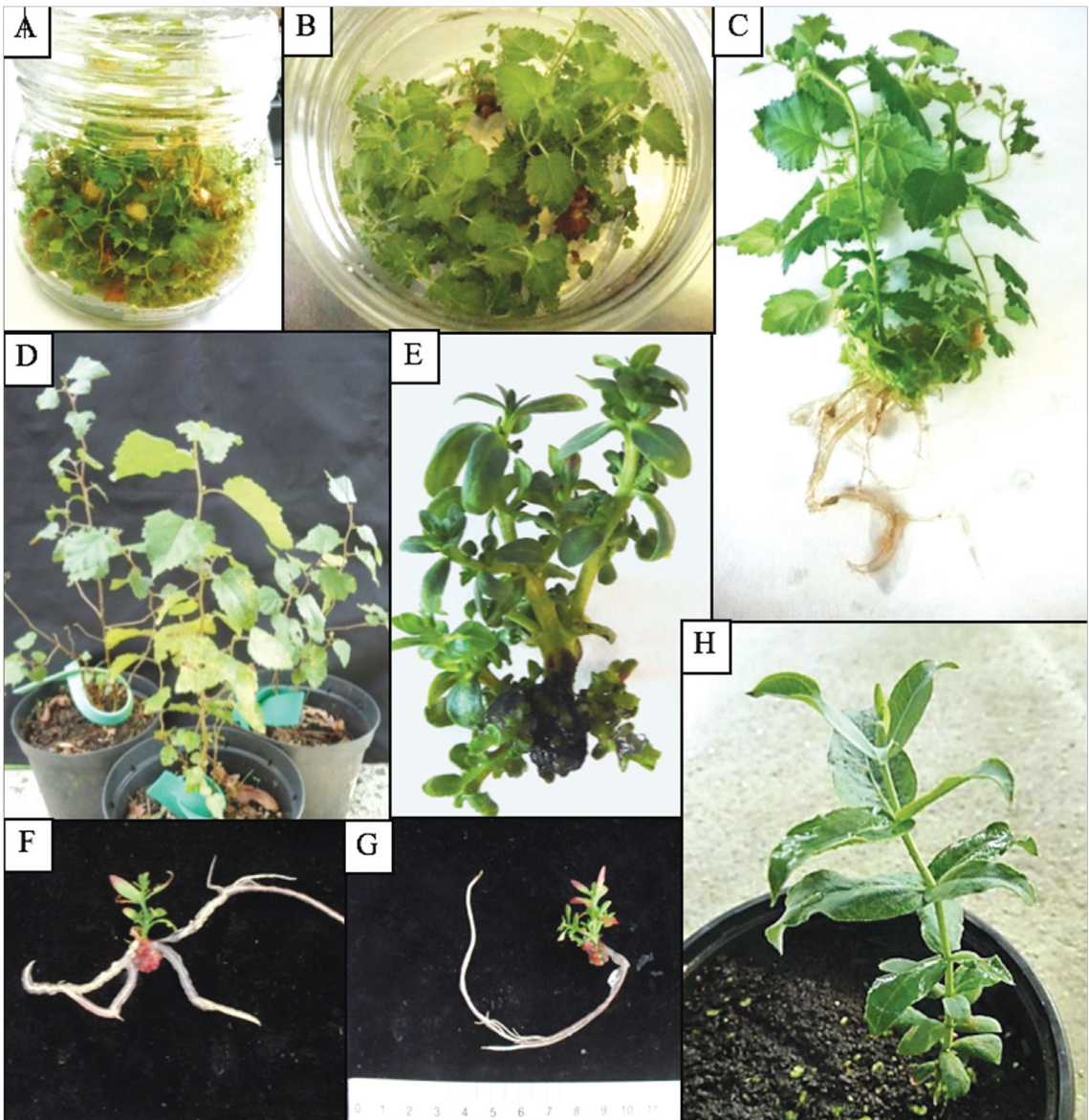


Figura 4. A-D) Cultivos de abedul n.º 17602 en fase de proliferación (A, B), enraizamiento espontáneo (C) y seis meses después de su transferencia a maceta (D). E-H) Eucalipto n.º 17619 cultivado *in vitro* durante la fase de multiplicación (E), durante el enraizamiento inducido por auxinas (F, G) y creciendo en invernadero (H).

tes para la obtención de plantas enraizadas en tres especies *Q suber*, *E globulus* y *B. pubescens*.

5. Agradecimientos

Se agradece la financiación recibida a través del contrato programa Xunta-CSIC Galicia 2014 y 2015. También se agradece la asistencia técnica de R. Sán-

chez, P. Val y A. Díaz, contratados mediante el Programa de Garantía Juvenil.

6. Bibliografía

- Ahuja, M.R. 1987. In vitro propagation of poplar and aspen. In: Bonga, J.M., Durzan, D.J. (eds.), *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Springer Science+Business Media, Dordrecht, pp 207-223. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0992-7_16
- Ballester, A., San-Jose, M.C., Vidal, N., Fernández-Lorenzo, J.L., Vieitez, A.M. 1999. Anatomical and biochemical events during in vitro rooting of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut. *Ann. Bot* 83, 619-629. <https://doi.org/10.1006/anbo.1999.0865>
- Bonga, J.M. 1982. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. In: Sala, F., Parisi, B., Cella, R. Ciferri, O. (eds.), *Tissue Culture in Forestry*. Elsevier/North-Holland. Biomedical Press, Amsterdam, pp 253-264. https://doi.org/10.1007/978-94-017-3538-4_13
- Bonga, J.M., Klimaszzewska, K.K., von Aderkas, P. 2010. Recalcitrance in clonal propagation, in particular conifers. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 100, 241-254. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9647-2>
- Catálogo de Árbores Senlleiras de Galicia. http://cmaot.xunta.gal/seccion-organizacion/c/CMAOT_DX_Conservacion_Natureza?content=Direccion_Xeral_Conservacion_Natureza/Biodiversidade/seccion.html&sub=Arbores_senlleiras
- Debergh, P.C., Read, P. E. 1991. Micropropagation. In: Debergh P.C., Zimmerman, R.H. (eds), *Micropropagation: Technology and Application*. Springer, Netherlands. (pp. 1-13) https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0_1
- Driver, J.A., Kuniyuki, A.H. 1984. In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. *HortSci.* 19, 507-509.
- Fogaça, C.M., Fett-Neto, A.G. 2005. Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of Eucalyptus species differing in recalcitrance. *Plant Growth Regul.* 45,1-10. <https://doi.org/10.1007/s10725-004-6547-7>
- Greenwood, M.S., Hutchinson, K.W. 1993. Maturation as a developmental process. In: Ahuja M.R., Libby, W.J. (eds.), *Clonal forestry I: genetics and biotechnology*. Springer, Berlin, pp 14-33. https://doi.org/10.1007/978-3-642-84175-0_3
- Gresshoff, P.M., Doy, C.H. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. *Planta* 107,161-170. <https://doi.org/10.1007/BF00387721>
- Hackett, W.P. 1985. Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plants. *Hortic. Rev.* 7, 109-155. <https://doi.org/10.1002/9781118060735.ch3>
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies junior, F.T., Geneve, R.L. 2011. *Plant Propagation: principles and practices*. Prentice Hall, New Jersey.
- Hernández, I., Celestino, C., Alegre, J., Toribio, M. 2003. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis: II. Plant regeneration from selected cork oak trees. *Plant Cell Rep.* 21, 765-770.
- Laimer, M., Rücker, W. 2012. *Plant Tissue Culture: 100 years since Gottlieb Haberlandt*. Springer Verlag Wien, New York.
- Licea Moreno, Ricardo Julián. 2016. *Bioteconología forestal aplicada a la producción de*

madera de nogal. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.

- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.* 15, 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Sakai, A., Kobayashi, S., Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanka) by vitrification. *Plant Cell Rep.* 9, 30-33. <https://doi.org/10.1007/BF00232130>
- Sanchez, C., Vieitez, A.M. 1991. In vitro morphogenetic competence of basal sprouts and crown branches of mature chestnut. *Tree Physiol.* 8, 59-70. <https://doi.org/10.1093/treephys/8.1.59>
- Sanchez, M.C., San-Jose, M.C., Ballester, A., Vieitez, A.M. 1996. Requirements for in vitro rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* derived from mature trees. *Tree Physiol.* 16, 673-680. <https://doi.org/10.1093/treephys/16.8.673>
- Sánchez, C., Rial, E., Turnes, L., Correa, B., Varas, E., Vidal, N. 2013. Use of a temporary immersion system (TIS) for micropropagation of axillary shoots and somatic embryos of *Quercus suber*. In: Abstracts of the 8th International Symposium on In Vitro Culture & Horticultural Breeding. p. 103.
- Vidal, N., Vieitez, A.M., Fernández, M.R., Cuenca, B., Ballester, A. 2010 Establishment of cryopreserved gene banks of European chestnut and cork oak. *Eur J Forest Res.* 129, 635-643. <https://doi.org/10.1007/s10342-010-0364-5>