

**Desarrollo de bancos de germoplasma de castaño y alcornoque  
mediante crioconservación de ápices caulinares y embriones  
somáticos**

NIEVES VIDAL<sup>1</sup>, ANA M. VIEITEZ<sup>1</sup>, M. ROSARIO FERNÁNDEZ<sup>2</sup> y BEATRIZ CUENCA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC, Apartado 122,  
15780 Santiago de Compostela*

<sup>2</sup>*TRAGSA, Departamento de Mejora Agroforestal, Crta. Maceda-Valdrey, Km. 2,  
32700 Maceda, Ourense*

*Correspondencia: [nieves@iiag.csic.es](mailto:nieves@iiag.csic.es), [bcuenca@tragsa.es](mailto:bcuenca@tragsa.es)*

**RESUMEN**

Los experimentos descritos en este trabajo demuestran la posibilidad de conservar, a largo plazo, germoplasma de castaño y alcornoque mediante la crioconservación de ápices caulinares y embriones somáticos, respectivamente. En ambos casos los explantos se han precultivado en un medio con alto contenido en sacarosa y posteriormente se han sometido al tratamiento de vitrificación mediante la solución PSV2 antes de la inmersión rápida en nitrógeno líquido. Los 23 clones de castaño crioconservados sobreviven a la acción del NL, pero la capacidad de recuperación de la formación de brotes (con porcentajes entre el 4 y el 53%) sólo fue posible en 16 de los clones estudiados. Cuando el compuesto Supercool al 0.1% se añadió a la solución de vitrificación PVS2, los porcentajes de supervivencia y recuperación de brotes aumentaron en los 8 clones estudiados.

Los embriones somáticos de los 17 clones de alcornoque sometidos a crioconservación recuperan su capacidad embriogénica, con tasas de recuperación que varían entre el 25 y el 100%. El protocolo de crioconservación para esta especie se ha simplificado en relación a los publicados previamente.

Los resultados obtenidos permiten, por vez primera, el desarrollo de un banco de germoplasma con fines aplicados de castaño y alcornoque.

**Palabras clave:** Ápices caulinares, banco de germoplasma, *Castanea sativa*, crioconservación, embriones somáticos, nitrógeno líquido, *Quercus suber*.

## ABSTRACT

This work describes experiments demonstrating the feasibility of long-term conservation of both shoot tips of European chestnut and somatic embryos of cork oak by cryopreservation. In the both cases, the explants have been pre-cultured on high-sucrose medium followed by the application of PVS2 vitrification solution prior cryostorage. Shoot recovery was obtained in 16 of the 23 chestnut clones tested, and the rates increased with the use of the compound Supercool during the vitrification procedure.

The somatic embryos of the all cork oak genotypes assayed (17) were successfully cryopreserved. The protocol for cryopreservation of cork oak has been simplified in relation to those previously published.

The results obtained show the possibility, for the first time, of the development of an applied gene bank for chestnut and cork oak.

**Key words:** *Castanea sativa*, chestnut, cork oak, cryopreservation, germplasm bank, liquid nitrogen, *Quercus suber*, shoot tips, somatic embryos.

## INTRODUCCIÓN

Se estima que el valor económico derivado de los beneficios que proporciona la biodiversidad al ser humano está comprendido entre los 13.000 y 54.000 millones de dólares por año. Sin embargo, sería enormemente limitante evaluar los beneficios de la biodiversidad solamente en términos económicos ya que permite al hombre disfrutar de otro tipo de beneficios entre los que se encuentran los científicos, estéticos, humanísticos, morales,

naturalísticos e incluso negativos, como puede ser la ansiedad derivada del estudio de su degradación (Kellert, 2005).

Muchos científicos están convencidos que la Tierra está inmersa en un episodio de extinción masiva de las especies (Wilson, 1993). En el reino vegetal, más de 33.000 especies de plantas vasculares están amenazadas, lo que supone el 12.5% del total, que se calcula en 270.000 especies. Aunque se están dando pasos para relativizar la crisis de la biodiversidad su perspectiva es incierta más allá del siglo XXI, a no ser que los éxitos en conservación se aceleren muchísimo (Avisé et al., 2008).

Las colecciones de semillas, colecciones en campo, huertos semilleros y los bancos clonales (bien *in situ* o *ex situ*) son las formas tradicionales de almacenamiento y conservación de los recursos genéticos vegetales. En el primer caso, sólo especies con semillas "ortodoxas" pueden conservarse por largos períodos de tiempo sin pérdida de su capacidad germinativa; sin embargo, las especies con semillas "heterodoxas" o recalcitrantes tienen una viabilidad muy limitada y su conservación en colecciones convencionales es problemática. Por otra parte, las colecciones en bancos clonales tienen algunas limitaciones: es necesaria una elevada superficie de terreno y una mano de obra especializada para su mantenimiento y conservación y estas colecciones están siempre expuestas tanto a incidencias abióticas (tormentas, fuego, inundaciones) como al ataque de agentes bióticos (plagas, enfermedades) que pueden poner en peligro, en cualquier momento, la propia supervivencia de la colección.

Las tecnologías del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ofrecen la posibilidad de desarrollar sistemas de almacenamiento y conservación de los recursos genéticos altamente eficaces que pueden ser complementarios a los bancos convencionales de germoplasma. Para que el sistema sea viable, es un requisito imprescindible que la especie a almacenar disponga de un protocolo de regeneración bien definido, para poder obtener plantas completas una vez pasado el período de almacenamiento. De los sistemas disponibles, el más sencillo es el almacenamiento del germoplasma producido *in vitro* a baja temperatura (2-4º C). Como ventajas en el uso de este método se pueden citar las escasas necesidades de espacio físico y los bajos costes laborales (los subcultivos del material pueden alargarse desde las 4 semanas en el mantenimiento rutinario de los cultivos hasta los 2 años), la eliminación de problemas relacionados con patógenos y la reducción de la erosión genética si se consiguen condiciones óptimas del almacenamiento (Engelmann, 1991). Diferentes factores parecen regular el éxito del almacenamiento en frío de los

cultivos in vitro: el estado fisiológico de los brotes, el tipo de explanto, el medio de cultivo, el tipo de contenedor, la temperatura y las condiciones de luz (Orlikowska, 1992). Utilizando este sistema, han podido almacenarse durante 12 meses a 2-4° C cultivos de diferentes clones de castaño, roble y cerezo (Janeiro y col., 1995). También se han obtenido frecuencias cercanas al 100% de viabilidad en 7 de los 8 clones o cultivares de *Camellia japonica* L. y *Camellia reticulata* Lindley almacenados en frío durante 12 meses (Ballester y col., 1997) o en cultivos de *Fagus sylvatica* durante 18 meses. En el trabajo de camelia se comprobó también que la encapsulación de los ápices de camelia en perlas de alginato es menos efectiva que el almacenamiento in vitro, ya que después de 75 días de almacenamiento sólo sobrevivieron el 10% de los ápices encapsulados.

A pesar de lo expuesto anteriormente, cuando es posible, la crioconservación (conservación del material vegetal en nitrógeno líquido, NL) es el método más seguro y más económico para la conservación a largo plazo de las especies que son propagadas vegetativamente o que tienen semillas que son recalcitrantes (heterodoxas) al almacenamiento (Pence, 1995). La condición indispensable para iniciar un proceso de crioconservación es disponer de un sistema de regeneración de plantas factible y repetitivo (por ejemplo, a partir de ápices caulinares o embriogénesis somática), que permita la recuperación de plantas completas después de que las células, órganos o tejidos hayan estado inmersos en NL. Aunque inicialmente los métodos de crioconservación se llevaron a cabo mediante un acondicionamiento de las células de los tejidos con crioprotectores y posterior enfriamiento lento, hoy día es más común utilizar metodologías basadas en la vitrificación de los tejidos, es decir, la transición del agua celular directamente de la fase líquida a una fase amorfa o vítrea, evitando la formación de cristales de hielo intra e intercelular (Sakai, 1995). El método de vitrificación conlleva el tratamiento de las muestras con sustancias crio-protectoras, deshidratación de los tejidos con soluciones de vitrificación con elevado potencial osmótico y enfriamiento inmediato por inmersión directa de las muestras en NL.

Es nuestra intención aplicar los procesos de crioconservación a dos especies forestales de enorme interés ecológico, ambiental, social, económico, etc.: castaño y alcornoque. Ambas especies están amenazadas bien por el ataque de patógenos o por una explotación irracional.

La Estrategia Forestal Española (MIMAM, 1999) del Ministerio de Medio Ambiente, asume una postura activa para la mejora y conservación de la biodiversidad, estableciendo la necesidad de crear una serie de herramientas

entre las que cabe señalar la Red de Mejora y Conservación de Recursos Genéticos Forestales. Por otra parte la mejora genética forestal se encuadra en el llamado Eje A.3 del Plan Forestal Español (2002) donde, entre otras, se consideran medidas como la determinación de la variabilidad genética de las especies forestales, establecimiento de las plantaciones de mejora, conservación, etc. La Ley de Montes (2003) establece en su artículo 53 que "el Ministerio de Medio Ambiente en colaboración con las Comunidades Autónomas elaborará y desarrollará programas de ámbito nacional que promuevan la mejora genética y la conservación de recursos genéticos forestales". Por otra parte uno de los objetivos específicos de la Estrategia Española para la Conservación y Uso Sostenible de los Recursos Genéticos Forestales (MIMAM, 2006) es apoyar los trabajos de mejora genética y conservación de recursos forestales. En el marco de todas estas políticas y medidas nacionales de conservación, que a su vez derivan de medidas europeas previas, se encuadra la trasposición de la Directiva 1999/105/CE a través del Real Decreto 289/2003 de 7 de marzo sobre Comercialización de Materiales Forestales de Reproducción (MFR) que se aplica a aquellos materiales que vayan a ser empleados en plantaciones con fines forestales, bien sea con carácter productor, protector o conservador de biodiversidad. La aplicación del RD establece que los materiales forestales comercializados para ser empleados en las plantaciones, correspondientes a 68 especies forestales y 3 géneros con híbridos artificiales, deben de estar inscritos en el Catálogo Nacional de Materiales de Base. En el anexo 1 del RD figura la especie *Castanea sativa* y entre los híbridos artificiales se recogen también los del género *Castanea*. El castaño es una especie susceptible del ataque de enfermedades fúngicas como son la tinta y el chancro.

Entre el año 2000 y 2005, el Departamento de Mejora Agroforestal (DMA) de TRAGSA en Maceda (Ourense) realizó una selección exhaustiva de ejemplares de castaño, empleando los datos del III Inventario Forestal Nacional, superpuestos con el Mapa Forestal, localizando en zonas de fuerte afección de la enfermedad, parcelas donde el castaño fuese primera o segunda especie. Se seleccionaron un total de 206 pies candidatos muestreando un total de 18.808,84 ha contenidas en 513 teselas del Mapa Forestal con presencia de castaño, en las zonas 1 y 2 de regresión del castaño según Bohuier (1979) (Rodríguez y col, 2005). Siguiendo metodologías ya definidas (Vieitez y col., 1986; Sánchez y col., 1997), estos 206 clones se han establecido in vitro para iniciar su propagación (Cuenca y col, 2009) y se han comenzado las tareas de testaje de resistencia y caracterización molecular que permita concluir el grado de resistencia que presentan los materiales con certeza. Durante el tiempo que duren los ensayos en campo, será necesario asegurar la

conservación del germoplasma seleccionado, muy valioso no sólo como posibles genotipos a reproducir e incluir en el Catálogo Nacional de Materiales de Base (CNMB) sino también como base genética amplia de un posible plan de mejora genética del castaño.

Por otra parte, esta misma empresa realizó entre 2002 y 2007 una selección de alcornos plus escogidos por su calidad y producción de corcho, en diferentes rodales selectos de cuatro Regiones de Procedencia extremeñas. Se seleccionaron en total 105 árboles con criterios productivos además de sanitarios y al mismo tiempo, cuidando de mantener una adecuada representación de los diferentes rodales que asegurara una elevada diversidad genética. Estos árboles han sido clonados mediante embriogénesis somática siguiendo la metodología definida por Hernández y col. (2003) en el caso de clonación de alcornos adultos, y la metodología definida por Bueno y col. (1992) en el caso de clonación de progenies. De este modo, en la actualidad disponemos de líneas embriogénicas correspondientes a 33 genotipos adultos, y se pretende clonar el máximo de árboles plus seleccionados. Se dispone además, de varios cientos de líneas embriogénicas correspondientes a las progenies de 73 de estos árboles, que fueron inducidas a partir de materiales embrionarios. Se han establecido ya tres parcelas con este tipo de materiales, con el objetivo de validar la superioridad productiva de los genotipos adultos, así como la heredabilidad del carácter a través de las progenies. El objetivo último, es de nuevo, proponer al Catálogo Nacional de Materiales de Base (CNMB) los clones seleccionados de alcornos o bien huertos semilleros establecidos con estos genotipos, como materiales cualificados. La crioconservación sería la herramienta que asegurara la conformidad genética de los materiales durante el período de ensayo, así como la conservación a largo plazo de los materiales seleccionados para futuras actuaciones de mejora en esta especie.

En el presente estudio se pretende investigar la posibilidad de crioconservar el material de castaño y alcornos previamente seleccionado en el DMA de TRAGSA y definir las condiciones de desarrollo de un banco de germoplasma a nivel aplicado. Puesto que en castaño el material es mantenido *in vitro* y usado para micropropagación a través del desarrollo de yemas axilares, se utilizará el proceso de crioconservación de ápices caulinares (Vidal y col., 2005) mientras que, en el caso del alcornos, la colección del material vegetal se encuentra en forma de líneas embriogénicas mantenidas mediante embriogénesis repetitiva o secundaria, por lo que se utilizará el sistema de crioconservación de embriones somáticos (Martínez y col., 2003; Valladares y col., 2004). En ambas especies se partirá de protocolos pre-establecidos y se

adaptarán, según necesidades, a cada uno de los clones y especies en estudio. Este es el primer intento de desarrollar bancos de germoplasma estables para el mantenimiento, a largo plazo, de estas dos especies.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Material vegetal y condiciones de cultivo**

Se han utilizado cultivos de brotes de castaño (*Castanea sativa* Mill) de 23 clones seleccionados de origen adulto (Tabla 1) y establecidos in vitro en el DMA (Maceda, Ourense). El material vegetal fue seleccionado en campo por sus características de aparente resistencia a la enfermedad de la tinta y en el momento presente están llevándose a cabo los ensayos de resistencia frente a *Phytophthora cinnamomi* y *P. cambivora*, causantes de la enfermedad de la tinta.

Por otra parte, se han utilizado 17 líneas embriogénicas de alcornoque (*Quercus suber* L) establecidas a partir de árboles seleccionados por su forma, tamaño, condición fitosanitaria y calidad del corcho localizados en 15 rodales selectos de 4 regiones de procedencia de Extremadura (Tabla 5).

Los cultivos de castaño se mantienen rutinariamente mediante proliferación de brotes axilares en medio basal GD (Gresshoff y Doy, 1972) suplementado con 0.4  $\mu\text{M}$  de N<sup>6</sup>-benzyladenina (BA), 0.09 M de sacarosa y 0.7% (w/v) Bacto agar a pH 5.6 y los subcultivos se llevan a cabo cada 5 semanas. Por su parte, las líneas embriogénicas de alcornoque, mantenidas mediante embriogénesis secundaria, se subcultivan mensualmente en medio basal consistente en los macronutrientes de Schenk y Hildebrandt (1972) (medio SH), micronutrientes, vitaminas y Fe-EDTA de Murashige y Skoog (1962), 0.09 M de sacarosa, 0.6% agar y sin reguladores de crecimiento. Los cultivos de las dos especies se incuban en cámaras de crecimiento bajo un fotoperíodo de 16 h suministrado por lámparas fluorescentes de luz blanca y fría (50-60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) con un régimen de 25°C en el período de luz y 20°C en el de oscuridad.

### **Crioconservación de ápices caulinares de castaño**

Se ha seguido el método descrito por Vidal y col. (2005) y Jorquera y col. (2005) modificado y adaptado al material vegetal disponible. A partir de cultivos de 3 a 5 semanas (Fig. 2A), se aislaron brotes de 10 mm de longitud que incluyen las yemas apical y axilares y se transfirieron a placas Petri con medio GD suplementado con 0.2  $\mu\text{M}$  BA, almacenándose en frío a 3-4°C durante 2 - 3 semanas bajo una luz tenue. Después de esta etapa de endurecimiento, se aislaron de la yema apical (bajo microscopio

estereoscópico y en la cabina de flujo estéril, Fig. 2B) ápices caulinares de 0,5-1 mm de tamaño que comprenden el meristemo apical y entre 3 y 6 primordios foliares (Fig. 2C). Estos ápices se precultivaron en medio basal con 0.2 M de sacarosa durante 48 horas a 4°C. Posteriormente, los ápices se dispusieron en crioviales y se sumergieron durante 20 minutos y a temperatura ambiente en una mezcla crioprotectora ("loading solution", Matsumoto y col., 1994) compuesta por 2 M glicerol + 0.4 M sacarosa y a continuación se deshidrataron en una solución de vitrificación PVS2 modificada (Sakai y col., 1990) consistente en 30% glicerol, 15% etilenglicol y 15% de dimetilsulfóxido (DMSO) en medio de cultivo GD con 0.4 M de sacarosa. El tiempo de exposición a la solución de PVS2 fue de 120 minutos a 0°C. Finalmente los ápices se suspendieron en crioviales conteniendo 0.6 ml de PVS2 y se sumergieron en NL (Fig. 2D).

En algunos ensayos, se ha estudiado la adición del compuesto Supercool (polyvinyl alcohol/vinyl acetate copolímero) al 0.1% a la disolución crioprotectora sobre la supervivencia y recuperación de brotes.

Para determinar la viabilidad del material crioconservado, parte de los crioviales que contienen los ápices se retiraron del tanque de NL al menos 24-48 h más tarde de iniciado el proceso, se calentaron en un baño de agua a 40°C durante 2 minutos, y se eliminó la solución PVS2 que se reemplazó por medio basal GD líquido suplementado con 1.2 M sacarosa durante 20 minutos. El medio de recuperación consistió en el medio basal GD suplementado con 2.2 µM BA, 2.9 µM ácido indolacético (AIA) y 0.9 µM zeatina. Los explantos se colocaron inicialmente sobre papel de filtro dispuesto sobre el medio de recuperación con agar reducido (0.6%) durante 24 h y luego fueron transferidos a medio de recuperación fresco con agar normal (0.7%). Las transferencias se repitieron a las 2 y 4 semanas. Después de 8 semanas de cultivo, se determinó la supervivencia de los cultivos como el porcentaje de explantos que han sobrevivido al efecto del NL (% supervivencia). Estos explantos fueron transferidos a tubos que contienen medio GD y 0.4 µM BA y a las 12 semanas se calculó el porcentaje de explantos que muestran desarrollo de brotes (% recuperación), es decir, entre de los explantos vivos, aquéllos que forman nuevos brotes mayores de 1 mm. Se utilizaron tres repeticiones por tratamiento y clon, con 12 ápices por repetición y cada experimento se repitió 2 veces.

### **Crioconservación de líneas embriogénicas de alcornoque**

Se ha seguido el método descrito por Valladares y col. (2004) con modificaciones. Las muestras consistieron en grupos de embriones somáticos (2-4 mg) en estado globular-torpedo aislados de los cultivos embriogénicos 3

Castaño	Etapas	Alcornoque
1	→ Cultivos en crecimiento activo	← 1
2	→ <i>Endurecimiento en frío (1-3 semanas)</i>	
3	→ Precultivo en sacarosa 0.2-0.3 M (1-3 días)	← 2
4	→ <i>Disolución protectora (20 min)</i>	
5	→ Vitricación con PVS2 (60-120 min)	← 3
6	→ Inmersión en nitrógeno líquido (< 48 h)	← 4
7	→ Descongelación, lavado e inoculación en medio de recuperación	← 5
8	→ <i>Transferencia a las 24 h, 2 y 4 semanas</i>	
9	→ Evaluación a las 8-12 semanas	← 6

**Figura 1.** Esquema de las etapas necesarias para la crioconservación de ápices caulinares de castaño (izquierda, 9 etapas) y embriones somáticos de alcornoque (derecha, 6 etapas).

semanas después del último subcultivo (Fig. 3A). Estos grupos de embriones (Fig. 3B) se precultivaron durante 3 días en medio SH basal que contiene 0.3 M sacarosa, se transfirieron posteriormente a crioviales y se sumergieron en la misma solución de vitricación PVS2 utilizada en el caso del castaño preparada en medio GD con 0.4 M sacarosa. Después de 60 minutos a temperatura ambiente, los grupos de embriones se resuspendieron en 0.6 ml de PVS2 y los crioviales se sumergieron directamente en NL (Fig. 3C). Para determinar la eficacia del procedimiento, parte de los embriones se retiraron de los tanques de NL, 24-48 horas después de la inmersión, se sumergieron en un baño de agua a 40°C y se eliminó la solución PVS2. Se lavaron con medio que contiene sacarosa 1.2 M y se transfirieron a placas con medio SH solidificado con la concentración de agar reducido (0,5%) sobre papel de filtro, siendo transferidos a las 24 horas a jarras de cultivo con medio SH solidificado con

agar en la concentración normal (0,6%). La capacidad de recuperación de los cultivos (% recuperación) se determinó como el porcentaje de explantos que mostraron recuperación de la capacidad embriogénica 8 semanas después de aislarlos del NL.

Con el objetivo de simplificar la metodología de crioconservación y adaptarla a las posibilidades prácticas de la empresa, se realizó una serie de experimentos para determinar la necesidad o no del uso de placas con papel de filtro durante las 24 primeras horas tras la descongelación. Asimismo se determinó la influencia de la duración del periodo de precultivo en sacarosa 0,3 M sobre los porcentajes de recuperación de la capacidad embriogénica.

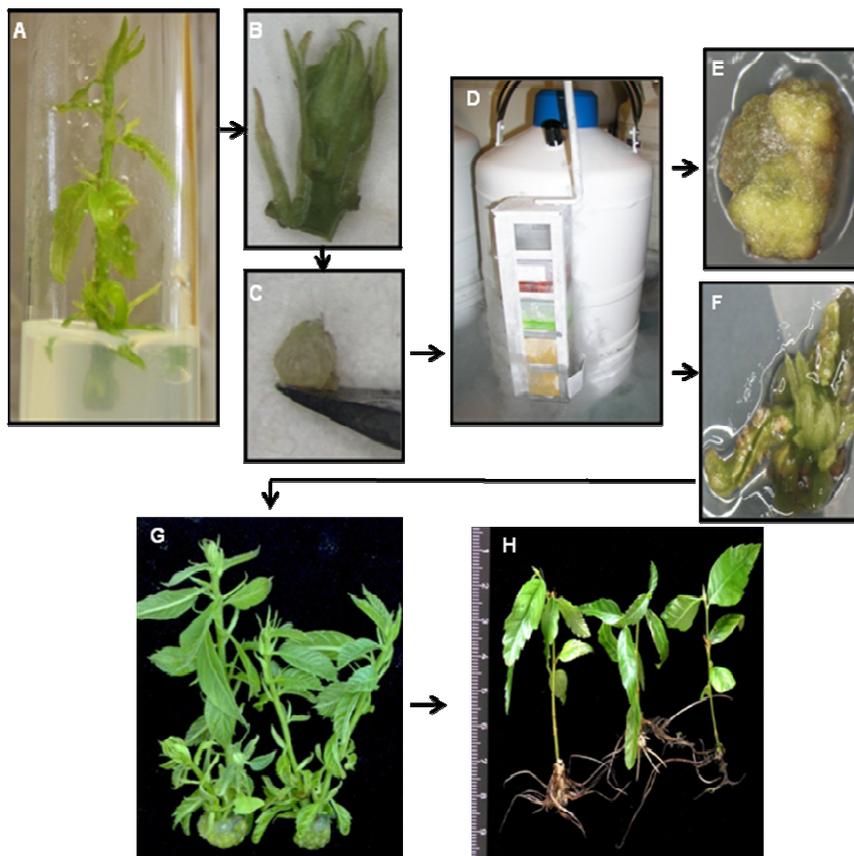
En la Figura 1, se presenta, de forma esquematizada, la metodología seguida para la crioconservación del castaño y del alcornoque.

## **RESULTADOS**

El método de crioconservación basado en el proceso de vitrificación es muy similar en el caso de los ápices caulinares de castaño y en el de los embriones somáticos de alcornoque (Fig. 1). Debido a la propia naturaleza del tejido utilizado (Fig. 2A, B, C), el procedimiento de la conservación de los ápices de castaño requiere de 3 etapas más que en el caso del alcornoque (Fig. 3A), como son el endurecimiento en frío de los cultivos, la utilización de una disolución protectora y la transferencia de los cultivos a las 24 h, 2 y 4 semanas después de retirarlos del NL.

### **Crioconservación de ápices caulinares de castaño**

En los 23 genotipos de castaño crioconservados, los ápices que fueron retirados del contenedor de nitrógeno líquido para evaluar su capacidad de recuperación presentaban inicialmente un color verde, pero a las pocas horas de su transferencia al medio de recuperación todos los explantos adquirieron un aspecto necrosado. Una vez transcurridas dos semanas desde la transferencia, comenzaron a aparecer zonas verdes que indicaban la reactivación del crecimiento en los explantos aparentemente necrosados. En algunos casos este nuevo crecimiento dio lugar a la formación de nuevos brotes (Fig. 2F) que pudieron observarse bajo microscopio estereoscópico a partir de las 4 semanas desde la transferencia, mientras que en otros casos sólo se obtuvo tejido desorganizado (callo) o a lo sumo la expansión de alguna hoja que terminó encalleciéndose (Fig. 2E). El hecho de que no todos los explantos que sobreviven formen brotes viables explica que los porcentajes de



**Figura 2.** Proceso de criopreservación de ápices caulinares de castaño. A, cultivo de brotes en proliferación; B, yema terminal; C, ápice caulinar utilizado como explanto en criopreservación; D, tanque de NL; E, cultivo en el que sólo se ha formado callo después de la recuperación del NL; F, formación de nuevos brotes en cultivos recuperados del NL; G, proliferación de brotes derivados de un ápice criopreservado; H, plantas completas regeneradas.

supervivencia sean sustancialmente mayores a los de recuperación de brotes. Los brotes formados pueden multiplicarse (Fig. 2G) y enraizarse (Fig. 2H), regenerando, de estas forma, plantas completas.

En la Tabla 1, se muestran los resultados obtenidos después de la criopreservación de 23 clones de castaño. Al cabo de 8 semanas se constata la supervivencia del 100% de los clones estudiados pero en 7 clones no se logró la recuperación de los cultivos. Esto significa, como se apuntó anteriormente, que en todos los clones de castaño criopreservados en NL hay explantos que

sobrevivieron pero en los citados 7 clones sólo se obtuvo formación de callo y no de desarrollo de brotes. El porcentaje de supervivencia no está relacionado con la capacidad de recuperación de los cultivos ya que hay clones con valores del 89% (clon CO31) y del 96% (clon PO39) que finalmente no consiguen recuperarse. El porcentaje de recuperación de brotes está relacionado, claramente, con el genotipo y varía desde valores tan bajos como el 2-4% (en los clones CO30 y PO20, respectivamente) hasta valores del 53% en el clon P034.

En otra serie de experimentos se trató de estudiar el posible efecto beneficioso de la adición del compuesto Supercool sobre la supervivencia y recuperación de los cultivos. Se comprobó (Tabla 2) el efecto positivo de la

**Tabla 1.** Efecto de la inmersión en nitrógeno líquido (NL) sobre la supervivencia y recuperación de la capacidad de multiplicación de ápices caulinares de 23 clones de castaño. Datos tomados a las 8 (supervivencia) y 12 semanas (recuperación) después del tratamiento con NL.

Clon	Nº Explantos en NL	Supervivencia (%)	Recuperación de brotes (%)
C007	70	32	5
C017	134	75	0
C030	392	33	2
C031	168	89	0
C032	80	61	6
C035	140	46	0
C047	168	100	12
C048	144	85	33
C086	100	71	0
L015	192	95	21
P001	166	97	25
P002	90	37	16
P014	140	30	0
P016	69	20	7
P020	192	74	4
P024	168	86	14
P026	110	40	0
P029	224	98	11
P034	160	53	53
P039	192	96	0
P042	110	35	12
P044	110	79	29
P049	120	85	13

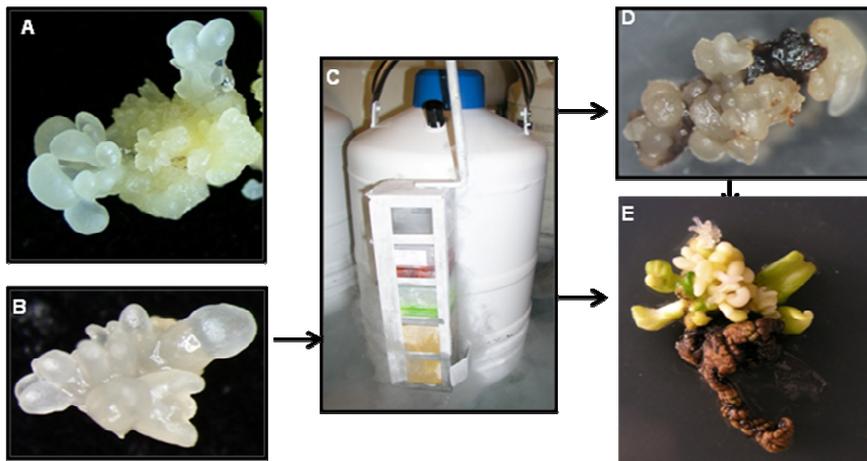
adición de este compuesto a la supervivencia de los clones estudiados con porcentajes que, en la mayoría de clones, alcanza el 100%. La excepción es el clon C030 en el que se observa un ligero aumento de la supervivencia con respecto a la acción de la solución crioprotectora PVS2 sin Supercool. En los clones que muestran recuperación de brotes con la solución PVS2, la adición de Supercool duplica el porcentaje de recuperación, incluso en el clon P029, la recuperación es 3 veces mayor que sólo con PVS2. Sin embargo, no se obtuvo efecto positivo alguno en aquellos clones en que la recuperación es ya nula o muy baja (clones P039, C030, C017), excepto en el clon P020 en donde la recuperación alcanza el 8% en presencia de Supercool.

**Tabla 2:** Influencia de la adición de Supercool 0,1% a la solución crioprotectora en la supervivencia y recuperación de brotes de 8 clones de castaño.

Clon	Supervivencia (%)		Recuperación de brotes (%)	
	PVS2	PVS2+SC0,1%	PVS2	PVS2+ SC 0,1%
C017	50	100	0	0
C030	30	36	3	0
C048	69	100	23	48
L015	100	100	8	17
P001	100	100	17	33
P020	56	92	0	8
P029	98	100	9	29
P039	92	100	0	0

### Crioconservación de líneas embriogénicas de alcornoque

Al igual que en el caso de los ápices de castaño, en el caso de los embriones somáticos de alcornoque una vez que fueron retirados del tanque de nitrógeno líquido para evaluar su capacidad de recuperación, adquirieron un aspecto necrosado a las pocas horas de su transferencia al medio de recuperación. Transcurridos unos 10 días de la descongelación y transferencia a medio de recuperación, comenzó a hacerse evidente la reactivación del crecimiento con la aparición de nuevas estructuras embriogénicas que surgían de los explantos iniciales mediante un proceso de embriogénesis secundaria (Fig. 3D, E). Los



**Figura 3.** Proceso de criopreservación de embriones somáticos de alcornoque. A, cultivo embriogénico proliferando mediante embriogénesis repetitiva de donde se aíslan los grupos de embriones (B) que serán sometidos a criopreservación en el tanque de NL (C). D y E, nuevos embriones somáticos regenerados a partir de los explantos criopreservados en NL.

embriones, una vez aislados, pueden someterse a los procesos de maduración y germinación y regenerar plantas completas.

El protocolo inicial de criopreservación de alcornoque (Valladares y col, 2004) incluye la inoculación de los embriones somáticos en placa sobre papel de filtro estéril y con la concentración de agar reducida durante las primeras 24 horas tras la descongelación y el lavado. Uno de los objetivos de nuestro trabajo consistió en simplificar y flexibilizar el protocolo de criopreservación para adaptarlo al manejo de un gran número de clones tratando de eliminar la etapa de inoculación sobre papel de filtro. En los 3 clones de *Q. suber* estudiados (Tabla 3) la eliminación de la inoculación o siembra sobre papel de filtro de los explantos no sólo no tiene efectos contraproducentes sino que parece favorecer ligeramente la recuperación de los cultivos (si bien las diferencias no son estadísticamente significativas). Por este motivo en los experimentos siguientes con los 14 clones restantes se eliminó este paso del protocolo de criopreservación.

**Tabla 3.** Tasas de recuperación embriogénica (%  $\pm$  error estándar) de embriones somáticos de 3 clones de alcornoque crioconservados y sembrados en medio de recuperación, bien directamente sobre el agar o tras un paso previo de 24 horas sobre papel de filtro. Los datos corresponden a medias de 3 repeticiones con 10 explantos cada una, y han sido tomados a las 8 semanas desde la aplicación de los tratamientos.

	% de recuperación		
	<u>DI5A (827/03)</u>	<u>DI1A (1200/03)</u>	<u>DII6A (470/04)</u>
Siembra sobre papel	87 $\pm$ 0,16	68 $\pm$ 0,83	81 $\pm$ 4,00
Siembra sin papel	91 $\pm$ 1,48	83 $\pm$ 1,92	82 $\pm$ 1,16

Por otra parte, también se evaluó el efecto de la duración del precultivo en sacarosa 0,3 M sobre la recuperación de la capacidad embriogénica de los explantos crioconservados, que en el protocolo original estaba fijada en 3 días. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4. En uno de los genotipos (clon DII3A (597/04)) la tasa de recuperación embriogénica es del 100%, independientemente de los días que hayan permanecido en el medio de precultivo. En los otros dos genotipos no se observan diferencias significativas en los porcentajes de recuperación, lo que indica que cualquiera de los periodos ensayados es igualmente eficiente para lograr la recuperación de la capacidad embriogénica de los cultivos de alcornoque.

**Tabla 4.** Tasas de recuperación embriogénica (%  $\pm$  error estándar) de embriones somáticos de 3 clones de alcornoque precultivados durante 1, 2 o 3 días en medio basal suplementado con sacarosa 0,3 M y crioconservados en nitrógeno líquido. Los datos corresponden a medias de 3 repeticiones con 10 explantos cada una, y han sido tomados a las 8 semanas de la descongelación e inoculación en el medio de recuperación.

Días de precultivo	% de recuperación		
	<u>Roza6A (1619/03)</u>	<u>DII3A (597/04)</u>	<u>DI1A (832/03)</u>
1	91,7 $\pm$ 1,70	100 $\pm$ 0	81,0 $\pm$ 1,58
2	82,6 $\pm$ 1,32	100 $\pm$ 0	76,3 $\pm$ 5,42
3	95,7 $\pm$ 1,32	100 $\pm$ 0	85,7 $\pm$ 2,65

Una vez adaptado el protocolo original de crioconservación de embriones somáticos de alcornoque, se procedió al inicio del desarrollo del banco de germoplasma con las entrada de 17 clones. A diferencia de lo observado en el caso del castaño, en todos los explantos que mostraron reactivación del crecimiento se obtuvieron nuevos embriones somáticos (de 6 a 10 nuevos embriones por explanto original reactivo, por término medio) que permitieron la recuperación del cultivo. En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de crioconservación de las líneas embriogénicas de alcornoque. El porcentaje de recuperación claramente depende del clon, pero todos los clones ensayados sobreviven al efecto del NL. El clon Rozo 1A(66/02) es el que presenta una reactividad más baja (25%) mientras que los clones DII3A (597/04), DII3A/02 y Chap A(752/04) alcanzan el 100% de explantos reactivos.

Teniendo en cuenta tanto el número de explantos que todavía están crioconservados como los porcentajes de recuperación calculados, puede decirse que la supervivencia de los clones ensayados está garantizada mientras se efectúa la evaluación en campo de los mismos.

**Tabla 5.** Efecto de la inmersión en nitrógeno líquido (NL) sobre la reactividad de los embriones somáticos de 17 líneas embriogénicas de alcornoque. Datos tomados 8 semanas después del tratamiento con NL.

Clon	Nº de explantos en NL	Recuperación (%)
Chap3A (743/04)	200	95
Chap3A (752/04)	110	100
DI1A (1200/03)	180	73
DI1A (832/03)	160	81
DI3A (744/03)	200	90
DI5A (827/03)	140	88
DII3A (597/04)	160	100
DII3A/02	110	100
DII6A (468/04)	140	35
DII6A (470/04)	160	81
DII6A (472/04)	80	42
DII6B/07	140	44
Rozo1A (66/02)	60	25
Rozo2A (41/02)	200	77
Rozo6A (140/04)	100	86
Rozo6A (142/03)	160	79
Rozo6A (1619/03)	140	90

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran claramente que es posible el desarrollo de bancos de germoplasma aplicados mediante el uso de ápices caulinares de castaño o embriones somáticos de alcornoque almacenados por tiempo indefinido en nitrógeno líquido. El banco, localizado en el DMA de TRAGSA en Maceda (Ourense), dispone en la actualidad de 16 genotipos de castaño y 17 de alcornoque perfectamente viables una vez recuperados del NL. El banco continuará completándose con nuevas entradas a medida que se conozcan los resultados de los ensayos que se llevan a cabo en la actualidad, permitiendo, de esta forma, la evaluación en campo de los genotipos crioconservados durante el período de tiempo que fuese necesario.

Cuando se analizan los resultados obtenidos en el proceso de crioconservación de castaño y alcornoque, el tipo de explanto utilizado en cada especie puede ser el hecho diferencial. El ápice caulinar de castaño utilizado en los ensayos contiene el meristemo apical y entre 3 y 6 primordios foliares que pueden contener células ya vacuoladas y muy diferenciadas y, por tanto, con más dificultades para superar el proceso de vitrificación. La formación de hielo intracelular durante el proceso de crioconservación lleva a la ruptura celular y consecuentemente a la muerte de los tejidos. En un estudio previo, Vidal y col. (2005) estudiaron el efecto del tamaño del ápice caulinar en la recuperación de los cultivos de castaño después del tratamiento con NL y encontraron que 0.5-1 mm era el tamaño más adecuado para permitir la recuperación de los cultivos de castaño. En términos generales se acepta que cuanto menor es el tamaño del ápice mayor y más homogéneo es el número de células de tipo meristemático pequeñas y poco vacuoladas, requisito importante en criogénesis, mayor es el éxito de la crioconservación. El tamaño del ápice ha tenido también una gran importancia en diferentes especies (Tagaki y col., 1997; Escobar y col., 1997; Niino y col., 1997). Además del tamaño como factor limitante, al aislar el ápice de la yema terminal del explanto se produce un daño físico debido al corte de los tejidos, daño que puede extenderse a todo el explanto y condicionar el proceso de crioconservación.

El estado fisiológico de la planta madre de la que se aísla el ápice en el momento de su aislamiento (Reed, 2000), el propio genotipo o la adición de distintos agentes crioprotectores pueden también afectar el éxito de la crioconservación del castaño. En el primer caso, aquéllos clones de castaño que no superaron el proceso de crioconservación (Tabla 1), podrían someterse a condiciones de crecimiento diferentes (contenido de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, tratamientos de luz/oscuridad, etc.) que

pudiesen dar lugar al aislamiento de ápices caulinares más proclives a la crioconservación. No es descartable que, a pesar de las mejoras potenciales que puedan introducirse, el propio genotipo sea el causante de la falta de recuperación en parte de los clones estudiados ya que no todos los genotipos responden igual a los mismos tratamientos (Vidal y col., 2005). Por otra parte, un hecho a resaltar de los resultados obtenidos en nuestro trabajo es el efecto positivo del polímero Supercool cuando se adiciona a la solución de vitrificación PVS2. La utilización de este crioprotector tuvo su reflejo en el aumento de la supervivencia y de la recuperación de los cultivos. El Supercool inhibe la formación de hielo en soluciones acuosas o crioprotectoras (Wowk y col., 2000) y ha mejorado la crioconservación de ápices caulinares de patata (Zhao y col., 2005). Además del Supercool, existen otros tipos de compuestos crioprotectores, entre los que se encuentran proteínas anticoagulantes que fueron utilizadas con éxito (Xia y col., 2000), aunque su elevado precio limita su aplicación a gran escala.

La capacidad de recuperación de los embriones somáticos de alcornoque tras la crioconservación es mayor que la de los ápices caulinares de castaño. En su conjunto, el embrión somático está formado por células de naturaleza embriogénica, de pequeño tamaño, poco vacuoladas y en división, lo que representa una mayor capacidad para el almacenamiento en NL que las estructuras más complejas como son los ápices caulinares. El estado de desarrollo de los embriones tiene una influencia notable en la posterior recuperación (Valladares et al. 2004). Por eso, hemos utilizado embriones en los estados globular y torpedo que responden mejor al almacenamiento en NL que los embriones más diferenciados como son los que están en estado cotiledonar. Además, los embriones somáticos se separan unos de otros con una gran facilidad, no se produce un daño físico por escisión del tejido a crioconservar, ya que pueden individualizarse fácilmente. Por otra parte, con que una célula de carácter embriogénico quede viva, puede regenerar un embrión, mientras que con los ápices caulinares es necesario que sobreviva el conjunto de la estructura organizada que constituye el meristemo, ya que, si sólo sobreviven unas pocas células, lo que se origina es un callo.

Cuando embriones somáticos de castaño se someten a crioconservación (Corredoira y col., 2004) se obtienen también mejores tasas de supervivencia y recuperación que con los ápices caulinares. Utilizando esta metodología ha sido posible también la crioconservación de líneas transgénicas de castaño transformadas con genes marcadores (Corredoira y col., 2007). Teniendo en cuenta estos resultados, parecería lógico que los bancos criogénicos de castaño se conformasen mediante cultivos embriogénicos (que, también

permiten la propagación clonal) en vez de ápices caulinares. Sin embargo, a día de hoy, es más factible el establecimiento *in vitro* de cultivos de castaño obtenidos mediante el desarrollo de yemas axilares (de cuyos brotes se aíslan los ápices caulinares) que la inducción de embriogénesis somática a partir de explantos de individuos adultos.

En nuestro estudio se ha simplificado el protocolo inicialmente propuesto para la crioconservación de *Q. suber* (Valladares y col., 2004). Se ha determinado que no es necesario inocular los explantos crioconservados sobre papel de filtro durante las primeras 24 horas tras la descongelación y lavado. Este paso había sido concebido inicialmente para eliminar los exudados que se producen en las primeras horas tras la siembra, pero los resultados obtenidos sugieren que o bien los exudados carecen de efecto tóxico o que la ausencia de manipulación de los explantos durante este periodo es beneficioso. Otra simplificación del protocolo está relacionada con el tiempo de permanencia de los embriones en el medio de precultivo con elevadas concentraciones de sacarosa. No se encontraron diferencias significativas entre 1 y 3 días de precultivo, lo que es una ventaja a la hora de programar y llevar a cabo todo el proceso de crioconservación.

Con el aumento de la tecnología de la crioconservación se ha hecho evidente la necesidad de garantizar la fidelidad del germoplasma almacenado en NL. La información disponible hasta el momento sobre los estudios moleculares en especies leñosas recuperadas del NL confirman la estabilidad genética de los cultivos, corroborando, de esta forma, la fiabilidad de las técnicas criogénicas en la conservación de especies leñosas (Lambardi y col., 2002). Recientemente, este aspecto se ha confirmado en ensayos de crioconservación de embriones somáticos de roble (Sánchez y col., 2008).

La mayoría de la investigación reciente sobre la crioconservación de cultivos embriogénicos en especies forestales está relacionado con las coníferas, en cuya explotación comercial esta técnica es rutinariamente aplicada a las líneas embriogénicas que están siendo evaluadas en campo (Cyr, 2000). En especies caducifolias, la aplicación práctica de esta tecnología está menos avanzada; sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la crioconservación a largo plazo de genotipos seleccionados de castaño y alcornoque es posible y, por tanto, el desarrollo aplicado de bancos de germoplasma para la conservación de forma indefinida de estas dos especies es factible.

## AGRADECIMIENTOS

El trabajo ha sido parcialmente financiado a través de los proyectos RECATI, código PGDIT07MRU003E (Plan INCITE, Xunta de Galicia) y SEFEAL, código CIT-010000-2007-5 (proyecto del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Inoovación Tecnológica (I+D+i 2004-2007) en la parte dedicada al fomento de la investigación técnica del Ministerio de Educación y Ciencia).

Se agradece al equipo del Dr. Mariano Toribio el haber suministrado las líneas embriogénicas de alcornoques adultos inducidas en el Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario y al equipo de la Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Bueno el suministro de las líneas embriogénicas de progenies utilizadas en este trabajo e inducidas en el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (en ambos casos, a través del proyecto SEFEAL).

**Comentario [AB1]:** Bea, matiza todo lo que quieras esta parte, pero creemos que hay que ser generosos y agradecer a Mariano lo que le corresponda. no nos cuesta nada.

## BIBLIOGRAFÍA

- Avise, J.C., Hubbell, S.P., Ayala, F.J. (2008) In the light of evolution II: Biodiversity and extinction. Proc. Nat. Acad. Sci., 105 suppl.1: 11453-11457.
- Ballester, A., Janeiro, L.V., Vieitez, A.M. (1997) Cold storage of shoot cultures and alginate encapsulation of shoot tips of *Camellia japonica* L. and *Camellia reticulata* Lindley. Sci. Hort., 71: 67-78.
- Bueno, M.A., Astorga, R., Manzanera, J.A. (1992) Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Quercus suber* L. Physiol. Plant., 85: 30-34.
- Corredoira, E., San-José, M.C., Ballester, A., Vieitez, A.M. (2004) Cryopreservation of zygotic embryo axes and somatic embryos of European chestnut. CryoLetters, 25: 33-42.
- Corredoira, E., San-José, M.C., Vieitez, A.M., Ballester, A. (2007) Improving genetic transformation of European chestnut and cryopreservation of transgenic lines. Plant Cell Tissue Organ Cult., 91: 281-288.
- Cuenca, B., Fernández, M.R., Ocaña, L., Salinero, C., Pintos, C., Mansilla, J.P., Rial, C. (2009) Selection of *Castanea sativa* Mill. for resistance to *Phytophthora cinnamomi*: testing of selected clones. Acta Hort. (en prensa)
- Cyr, D. R. (2000) Cryopreservation: roles in clonal propagation and germplasm conservation of conifers. En Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm.

- Current Research Progress and Application. F. Engelmann y H. Takagi (eds.). IPGRI, Rome, Italy, pp. 261-268.
- Directiva 1999/105/CE del Consejo, de 22 de diciembre de 1999, sobre la comercialización de materiales forestales de reproducción. *DO L 11 de 15.1.2000, p. 17/40*
- Engelmann, F. (1991) In vitro conservation of tropical plant germplasm – a review. *Euphytica* 57: 227-243.
- Escobar, R.H., Mafla, G., Roca, W.W. (1997) A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. *Plant Cell Rep.*, 16: 474-478.
- Gresshoff, P.P., Doy, C.H. (1972) Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. *Planta*, 107: 167-170.
- 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.
- Janeiro, L.V., Vieitez, A.M., Ballester, A. (1995) Cold storage of in vitro cultures of wild cherry, chestnut and oak. *Ann. Sci. For.*, 52: 287-293.
- Jorquera, L., Vidal, N., Sánchez, C., Vieitez, A.M. (2005). Optimizing conditions for successful plant regeneration from cryopreserved *Castanea sativa* shoot tips. *Acta Hort.* 693: 511-518.
- Keller, S.R. (2005) Perspectives on an ethic toward the sea. Benthic Habitats and the Effects of Fishing, eds. Bames, P.W., Thomas, J.P. (American Fisheries Soc., Symposium 41, Bethesda, MD), pp 703-712.
- Lambardi, M., Lynch, P.T., Benelli, C., Mehra, A. (2002) Towards the cryopreservation of olive germplasm. *Adv. Hort. Sci.*, 16: 165-174.
- LEY 43/2003, de 21 de noviembre, de Montes. [www.boe.es/boe/dias/2003/11/22/pdfs/A41422-41442.pdf](http://www.boe.es/boe/dias/2003/11/22/pdfs/A41422-41442.pdf)
- Martínez, M.T., Ballester, A., Vieitez, A.M. (2003) Cryopreservation of embryogenic cultures of *Quercus robur* using desiccation and vitrification procedures. *Cryobiology*, 46: 182-189.
- Matsumoto, T., Sakai, A., Yamada, K. (1994) Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Plant Cell Rep.*, 13: 442-446.

- MIMAM (1999) Estrategia Forestal Española. Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Madrid. 297 pp.
- MIMAM (2006) Estrategia de Conservación y uso sostenible de los recursos genéticos forestales. Dirección General de Biodiversidad. Madrid. 81 pp.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Niino, T., Tashiro, K., Suzuki, M., Ohuchi, S., Magoshi, J., Akihama, T. (1997) Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification. *Sci. Hort.*, 70: 155-163.
- Orlikowska, T. (1992) Effect of in vitro storage at 4° C on surviving and proliferation of two apple rootstocks. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 31: 1-7.
- Plan Forestal Español (2002-2032) Aprobado por el Consejo de Ministros el 5 de julio de 2002. [www.la-moncloa.es/ConsejodeMinistros/Referencias/\\_2002/c0507020.htm#PlanForestal](http://www.la-moncloa.es/ConsejodeMinistros/Referencias/_2002/c0507020.htm#PlanForestal)
- Pence, V.C. (1995) Cryopreservation of recalcitrant seeds. En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 32 *Cryopreservation of Plant Germplasm I*. Y.P.S. Bajaj (ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, 29-50.
- REAL DECRETO 289/2003, de 7 de marzo, sobre comercialización de los materiales forestales de reproducción. (BOE nº 58 del 8 de marzo de 2003. pp. 9262-9299).
- Reed, B.M. (2000) Genotype considerations in temperate fruit crop cryopreservation. En: Engelmann, F., Takagi, H. (eds.) *Cryopreservation of tropical plant germplasm*. IPGRI, Roma, pp. 200-204.
- Rodríguez, L., Cuenca, B., López C.A., Lario, F.J., Ocaña, L. (2005) Selection of *Castanea sativa* Mill. genotypes resistant to ink disease in Galicia (Spain) *Acta Hort.*, 693: 645-651.
- Sakai, A., Kobayashi, S., Oiyama, I. (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.*, 9: 30-33.
- Sakai, A. (1995) Cryopreservation of germplasm of woody plants. En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 32 *Cryopreservation of Plant Germplasm I*. Y.P.S. Bajaj (ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, 53-69.

- Sánchez, M.C., San-José, M.C., Ferro, E., Ballester, A., Vieitez, A.M. (1997) Improving micropropagation conditions for adult-phase shoots of chestnut. *J Hort Sci* 72:433-443.
- Sánchez C, Martínez, M.T., Vidal, N., San-José, M.C., Valladares, S., Vieitez, A.M. (2008) Preservation of *Quercus robur* germplasm by cryostorage of embryogenic cultures derived from mature trees and RAPD analysis of genetic stability. *CryoLetters*, 29: 493-504.
- Schenk, R.U., Hildebrandt, A.C. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. *Can. J. Bot.*, 50: 199-204.
- Tagaki, H., Thinh, N.T., Islam, O.M., Senboku, T., Sakai, A. (1997) Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. I. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. *Plant Cell Rep.*, 16: 594-599.
- Valladares, S., Toribio, M., Celestino, C., Vieitez, A.M. (2004) Cryopreservation of embryogenic cultures from mature *Quercus suber* trees using vitrification. *CryoLetters*, 25: 177-186.
- Vieitez, A.M., Vieitez, M.L., Vieitez, E. (1986) Chestnut (*Castanea* spp). In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry* vol 1. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 393-414
- Vidal, N., Sánchez, C., Jorquera, L., Ballester, A., Vieitez, A.M. (2005) Cryopreservation of chestnut by vitrification of in vitro-grown shoot tips. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 41: 63-68.
- Wilson, E.O (1993) *The Diversity of Life*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Wowk, B., Leidl, E., Rasch, C.M., Mesbah-Karimi, N., Harris, S.B., Fahy, G.M. (2000) Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology*, 40: 228-236.
- Xia, H.Y., Harvey, K., Labarrers, C.A., Kovacs, R. (2000) Plantlet cryopreservation using a combination of epinephrine and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. *Cryobiology*, 41: 97-105.
- Zhao, M.A., Xhu, Y.Z., Dhital, S.P., Khu, D.M., Song, Y.S., Wang, M.Y., Lim, H.T. (2005) An efficient cryopreservation procedure for potato (*Solanum*

*tuberosum* L.) utilizing the new ice blocking agent, Supercool X1000. Plant Cell Rep., 24: 477-481.