



2022
Lleida

27·1
junio · juny
julio · juliol

Cataluña
Catalunya

8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**

8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Cataluña | Catalunya · 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022
ISBN 978-84-941695-6-4
© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Organiza



Clonación de genotipos adultos y juveniles de *Quercus suber* y *Q. ilex* tolerantes a *Phytophthora cinnamomi*

CUENCA VALERA, B.¹, ARRILLAGA MATEOS, I.², ALBORCH BENAVENT, A.², CORREDOIRA CASTRO, E.³, FERNÁNDEZ GARCÍA, M.L.⁴, FERNÁNDEZ MARTÍNEZ, M.⁴, HERNÁNDEZ SÁNCHEZ, I.⁵, MARTÍNEZ SANTIAGO, M.T.³, MOSTEIRO MEIJIDE, F.³, PÉREZ OLIVER, M.A.², QUEVEDO DÍAZ, A.⁴, SÁNCHEZ DÍAZ, M.A.², RUIZ GALEA, M.M.⁵, TAPIAS MARTÍN, R.⁴, VILLAREAL CRIADO, M.C.⁵, PÉREZ MARTÍN, F.⁶

¹ TRAGSA. Vivero de Maceda. Crta. Maceda-Baldrei, km 2, 32700 Maceda, Ourense.

² Instituto BiotecMed, Departamento Biología vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia.

³ Grupo de Biotecnología y Mejora Forestal. Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG-CSIC). Avda. de Vigo s/n. 15705 Santiago de Compostela, A Coruña.

⁴ Departamento Ciencia Agroforestales. Universidad de Huelva. Campus La Rábida. 21819 Palos de la Frontera, Huelva.

⁵ Departamento Investigación Agroambiental. Grupo Biotecnología Forestal. Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA). Finca El Encín. Ctra. A-2, Km. 38,2. 28800 Alcalá de Henares, Madrid.

⁶ Dirección General de Biodiversidad, Bosques y Desertificación. Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico.

Resumen

El síndrome de “la seca” está generando desde hace décadas la pérdida de masas de *Quercus* mediterráneos provocando grandes pérdidas económicas y ecológicas. Por ello, en 2019 el subgrupo de “Mejora Genética y Fisiología” del Grupo de Trabajo sobre Seca del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico impulsó el Programa Nacional para la Conservación y Mejora de Recursos Genéticos de Encina y Alcornoque. Este programa contempla la clonación y la conservación de material tolerante a *Phytophthora cinnamomi* y/o sequía, seleccionado en anteriores proyectos de investigación. Aplicando técnicas de cultivo *in vitro*, embriogénesis somática y proliferación de yemas axilares, se pretende clonar una selección de individuos dentro de las progenies más tolerantes, y los mejores genotipos adultos evaluados a través de esas progenies. Las hojas son el explanto elegido para inducir embriones somáticos en material juvenil y adulto de alcornoque; en material de encina adulto el explanto inicial es el tegumento del embrión inmaduro. Las líneas embriogénicas generadas han sido conservadas a largo plazo mediante su crioconservación (almacenamiento en nitrógeno líquido). La proliferación de yemas axilares se emplea para clonar genotipos juveniles de ambas especies. La clonación del material permitirá disponer de copias suficientes que permitan la evaluación de su tolerancia en ensayos de campo.

Palabras clave

Alcornoque, encina, crioconservación, micropropagación, seca.

1. Introducción

La “seca” de encinas y alcornocales es un síndrome complejo que causa el deterioro general y gradual de los árboles afectados hasta su muerte, debido en primera instancia a la podredumbre radical producida por patógenos de suelo del género *Phytophthora*, pero también influenciada por factores tanto antropogénicos (como el manejo de las dehesas) como naturales (estrés hídrico y térmico, y otras plagas y enfermedades) incluyendo los efectos del cambio climático (RUIZ-GOMEZ et al., 2019). Este síndrome es la principal amenaza hoy en día de la salud de dehesas y monte alcornocal.

Una buena gestión y algunos tratamientos químicos pueden ser útiles para mejorar la situación, pero la identificación de genotipos adultos tolerantes en focos de seca y la selección de

genotipos tolerantes a partir de sus progenies junto con la propagación vegetativa, son fundamentales, para producir los materiales de base necesarios en los futuros programas de reforestación. (ALÍA et al., 2005). Y esta selección, combinada con la propagación clonal es una alternativa interesante para proveer el mercado de árboles tolerantes.

Por este motivo, la Subdirección General de Política Forestal y Lucha contra la Desertificación, del Ministerio para Transición Ecológica y Reto Demográfico (MITECO) inició a finales de 2019 el Programa Nacional de Mejora y Conservación de Recursos Genéticos de la encina y el alcornoque frente al síndrome de la seca, desarrollado en el marco del Programa Nacional de Desarrollo Rural, que contempla entre otras tareas, la clonación utilizando técnicas biotecnológicas, de material de encina y alcornoque seleccionado por su tolerancia al estrés hídrico y a *P. cinammomi*, procedente de proyectos y actuaciones previas de algunos de los organismos colaboradores en el Programa.

2. Objetivos

Se pretende desarrollar y optimizar, protocolos de micropropagación de encinas y alcornoques, mediante embriogénesis somática y/o cultivo de yemas axilares, para poder aplicarlos a la producción comercial y así poner a disposición del sector forestal materiales mejorados tolerantes a la seca. Al mismo tiempo, las líneas embriogénicas generadas se criopreservarán para su mantenimiento a largo plazo en condiciones estables desde el punto de vista genético.

3. Metodología

Las colecciones cuya micropropagación se ha abordado son las siguientes:

- Colección proyecto RESSECA: 51 brinzales de encina y 142 de alcornoque supervivientes a 2 años de inoculación con *P. cinammomi* y estrés hídrico, así como sus progenitores, 6 genotipos encina y 6 de alcornoque adultos.
- Colección proyecto SEFEAL: 13 alcornoques adultos jóvenes (11 años), procedentes de embriogénesis somática, seleccionados por crecimiento en ensayos clonales, de los que se había perdido la línea embriogénica original.
- Colección de la Universidad de Extremadura: 34 brinzales de encina seleccionados por tolerancia a *P. cinammomi* y estrés hídrico, así como sus progenitores, 8 encinas adultas.
- Colección de la Universidad de Huelva: 16 brinzales de encina y 14 de alcornoque, seleccionados por tolerancia a *P. cinammomi*, así como sus progenitores, 8 encinas y 8 alcornoques adultos.
- Clonación PN seca: brinzales supervivientes a 2 años de inoculación con *P. cinammomi* y estrés hídrico (número aún por determinar) y sus progenitores.

Micropropagación de los genotipos adultos de encina y alcornoque: se ha abordado por parte del IMIDRA mediante embriogénesis somática, en encina a partir de tegumentos de bellotas inmaduras empleando el protocolo de BARRA-JIMÉNEZ et al. (2014), y en alcornoque a partir de hojas de brotes epicórmicos de estacas de ramas según el protocolo establecido por TORIBIO et al. (2005).

Tras la desinfección y posterior disección de las bellotas inmaduras, en el caso de la encina, y desinfección de las hojas en el caso del alcornoque, se aplicó el protocolo de inducción de embriogénesis somática. Brevemente, consistió en el cultivo del explanto en el medio MS (MURASHIGE y SKOOG, 1962) con macronutrientes de SH (SCHENK y HILDEBRANDT, 1972) aplicando los reguladores de crecimiento ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA) en tres fases, primero a concentración alta, en una segunda fase a concentración reducida y en una tercera fase sin la adición de estos reguladores. En el caso de la encina no es necesaria la aplicación de reguladores. Los embriones somáticos (ES) formados se transfirieron a medio de cultivo sin

reguladores de crecimiento para su multiplicación mediante embriogénesis secundaria o recurrente. Tras la maduración de los embriones, estratificación y germinación, las plántulas somáticas se transfirieron a sustrato; turba, fibra de coco y perlita expandida (2:2:1), para su aclimatación (Figura 1).

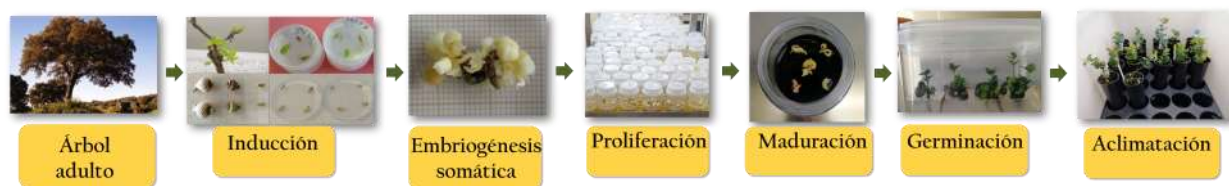


Figura 1. Proceso de inducción de embriogénesis somática y de producción de plántulas somáticas en alcornoques y encinas adultas.

Micropropagación de los genotipos juveniles de alcornoque mediante embriogénesis somática: se ha abordado por parte de la **Universidad de Valencia**, según el protocolo descrito por el IMIDRA (HERNÁNDEZ et al., 2011.) utilizando hojas de los brinzales de la colección RESSECA en expansión que, una vez esterilizadas, se transfirieron sucesivamente a los medios de establecimiento, inducción y manifestación con concentraciones decrecientes de ANA y BA. Los ES una vez diferenciados, producen embriogénesis secundaria en medio SH sin reguladores de crecimiento. Los embriones cotiledonares bien formados se estratificaron en frío 1-2 meses antes de proceder a su germinación y posterior aclimatación a condiciones *ex vitro*.

Micropropagación de los genotipos juveniles de alcornoque mediante cultivo de yemas axilares: se ha abordado por parte de la Universidad de Huelva y de TRAGSA. En la **Universidad de Huelva** se abordó la clonación de sus propias colecciones. Para ello, los brotes una vez desinfectados, se dividieron en segmentos nodales con 1 o 2 yemas y se dispusieron en cultivo en medio MS con el nitrógeno reducido a la mitad (MS 1/2N), suplementado con 0,5 mg/L de BA, 80 mg/L ácido ascórbico, y 30 g/L de sacarosa. Para la multiplicación se empleó una modificación del protocolo de GARCÍA (2016), empleando medio MS 1/2N suplementado con 0,3 mg/L de BA y 2 mg/l ácido indol-3-butírico (AIB). En el **vivero de TRAGSA**, se abordó la clonación de 40 genotipos de las colecciones RESSECA y SEFEAL. Los brotes se establecieron en medio GD (GRESSHOFF y DOY, 1972) adicionado con 0,2 mg/L de BA (VIEITEZ et al., 2009). Para optimizar la elongación de los brotes se ensayaron diferentes combinaciones de BA y ANA en el medio proliferación (GD con micros y vitaminas específicos), seguido de una fase de elongación en medio MS 1/2N bien semisólido (en jarras) o líquido (sistema de inmersión transitoria, SIT). Para optimizar el enraizamiento, se compararon los resultados de varios sistemas: enraizamiento *in vitro* en medio semisólido GD con los macronutrientes reducidos a un tercio y 10 g/L de sacarosa; *in vitro* en GD líquido usando lana de roca como soporte; *in vitro* en GD semisólido completo con 20 g/L de sacarosa durante 2 w y posterior paso a vermiculita en condiciones fotoautotróficas (con CO₂ y luz PAR); enraizamiento directo en una mezcla de turba, coco y perlita; y directo en bandejas con sustrato Jiffy® VeCO1. Para la inducción de raíces se comparó el efecto de la inmersión basal en una solución 1 g/L de AIB durante 2 min; en una solución menos concentrada (75 mg/L) *overnight*; o en una solución 0,5 g/L seguida por un periodo de oscuridad de una semana.

Micropropagación de los genotipos juveniles de encina mediante cultivo de yemas axilares: se ha investigado en el IIAG y en la **Universidad de Huelva**. En el **IIAG**, se ha empleado el protocolo de micropropagación vía yemas axilares previamente definido por el grupo (MARTÍNEZ et al., 2020) (Figura 2). A fin de controlar las tasas de contaminación y obtener brotes más vigorosos, se forzó la brotación de los brinzales de RESSECA y de la UnEx bajo condiciones controladas de humedad y temperatura en cámara climática. Para su establecimiento *in vitro*, los nuevos brotes generados fueron aislados, esterilizados y cultivados en medio Woody Plant Medium (WPM) (LLOYD y MCCOWN, 1980) suplementado con 30 g/L de sacarosa, 0,2 mg/L BA y 7% agar (w/v). Las fases de

estabilización y proliferación se han abordado aplicando ligeras modificaciones del protocolo inicial para adaptarlo a cada genotipo, reduciendo la concentración y ciclos de aplicación de la BA. Una vez estabilizadas y determinadas las tasas de proliferación y enraizamiento de cada genotipo, los cultivos de brotes axilares se almacenan a medio plazo en condiciones de luz y temperatura reducida (4°C) durante 12 meses. En la **Universidad de Huelva**, los brotes de los genotipos de su propia colección, se establecieron tras la desinfección, en medio WPM suplementado con 0,5 mg/L de BA, 80 mg/L ácido ascórbico y 30 g/L de sacarosa. Para la multiplicación se empleó también el protocolo de MARTÍNEZ et al. (2020) con algunas modificaciones. Así la concentración de citoquinina (BA) se redujo a 0,2 o 0,1 mg/L según el clon y la fase de cultivo, y se añadió tiosulfato de plata (STS) 20 µM.



Figura 2. Etapas de la micropropagación de genotipos juveniles de encina mediante la proliferación de yemas axilares.

Crioconservación de líneas embriogénicas: Este objetivo se ha abordado en el IIAG. Todas las líneas embriogénicas generadas en el programa a partir de árboles adultos (IMIDRA) y material juvenil (UV), están siendo almacenadas a largo plazo aplicando técnicas de crioconservación, almacenamiento en nitrógeno líquido (NL), siguiendo el protocolo de vitrificación definido previamente por el grupo (VALLADARES et al., 2004). Para ello, grupos de 2-3 embriones somáticos en estado globular y aislados bajo estereomicroscopio se precultivan durante 3 días en medio SH suplementado con 0,3M de sacarosa. A continuación, los embriones se transfieren a crioviales de 2 mL con 1,8 mL de solución de vitrificación PVS2 (SAKAI et al., 1990) donde permanecen durante 60 min a 0°, antes de ser introducidos en el tanque de NL. De cada línea se han almacenado 8-9 viales con 12-15 ES/vial. Después de 1 mes en NL, se retiran del tanque 3 viales/línea para determinar las tasas de supervivencia y la capacidad de recuperación embriogénica tras su almacenamiento. A fin de garantizar la recuperación de las líneas tras su crioconservación, como criterio de evaluación se ha establecido que es necesario obtener al menos un 50% de recuperación embriogénica para considerar eficiente el procedimiento de almacenamiento aplicado.

4. Resultados

Micropropagación de los genotipos adultos de encina y alcornoque: se han conseguido líneas embriogénicas, de 17 de los 18 genotipos de alcornoque recibidos, con una media de 39,8% respuesta embriogénica (Figura 3). La germinación media es del 75% (variando entre el 58% y el 91% según genotipo) y la aclimatación media fue del 55% (variando entre el 0% y el 92% según genotipo) (Figura 3). En encina, se introdujeron en cultivo *in vitro* 1.740 óvulos, de los que sólo una línea se encuentra en la fase de proliferación. No se ha podido establecer de momento ninguno de los 22 genotipos abordados.

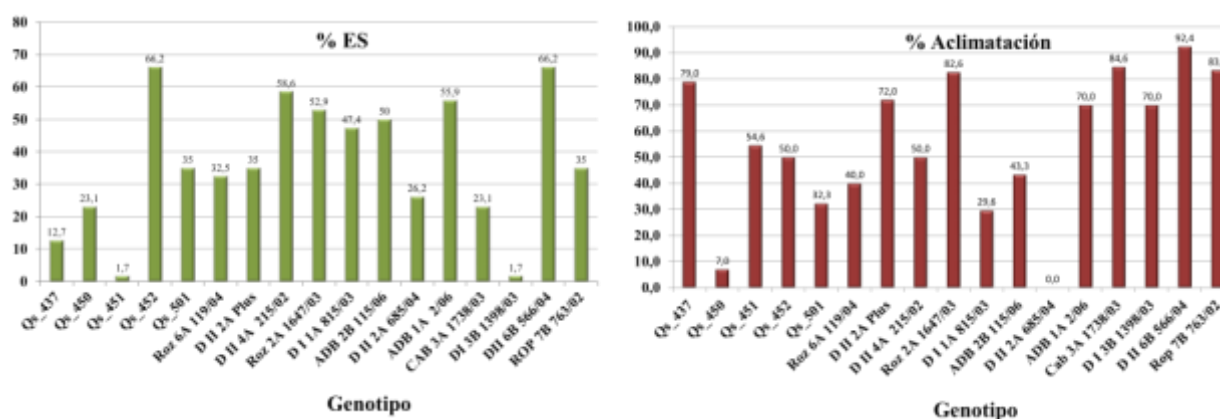


Figura 3. Porcentajes de embriogénesis somática y aclimatación conseguidos con las 17 líneas embriogénicas inducidas en el IMIDRA.

El IMIDRA está ya produciendo plántulas somáticas de los alcornoques adultos para la evaluación de su tolerancia a *P. cinnamomi* y el establecimiento de ensayos en campo (Figura 4).



Figura 4. Plántulas somáticas de alcornoque producidas en el IMIDRA listas para la evaluación de tolerancia a *P. cinnamomi*

Micropropagación de los genotipos juveniles de alcornoque mediante embriogénesis somática: la Universidad de Valencia ha establecido líneas embriogénicas a partir de 23 de los 30 genotipos ensayados hasta el momento (77%) (Figuras 5A y 5B) observándose un efecto materno en la respuesta embriogénica (entre el 40 y el 100 % según el parental femenino) (Tabla 1). Los embriones maduraron en el mismo medio (Figura 5C). Las tasas de conversión a planta oscilaron entre el 20 y el 70% dependiendo del genotipo. La aclimatación de las plántulas obtenidas es, en la actualidad, el principal cuello de botella para poder producir el suficiente número de ejemplares para el programa de mejora. Hasta el momento, se han obtenido plantas con crecimiento vigoroso en el 57 % de los genotipos ensayados.

Tabla 1. Embriogénesis somática en explantos foliares de alcornoques juveniles en la Universidad de Valencia

Familia	Progenies (genotipos)	Nº hojas/progenie	Genotipos capturados (%)	Embriones maduros (Rango)
Qs-450	5	200	5 (100)	40-1680
Qs-451	7	100-200	7 (100)	7-73
Qs-452	5	130-230	2 (40)	137-234
Qs-437	10	70-200	7 (70)	3-637
Qs-501	3	150	2 (66)	03-10
TOTAL	30	4218	23 (77)	11000



Figura 5. Embriones somáticos inducidos en hojas (A), línea embriogénica recurrente (B), plántulas somáticas de alcornoque germinadas *in vitro* (C) y aclimatadas en la Universidad de Valencia (D)

Micropropagación de los genotipos juveniles de alcornoque mediante cultivo de yemas axilares: En la Universidad de Huelva, se han podido establecer 26 de los 31 genotipos abordados de alcornoque (84%), 16 de los cuales (52%) se multiplican regularmente en medio MS 1/2N suplementado con 0,3 mg/L de BA y 2 mg/l de AIB (Tabla 2). Hasta el momento no se ha iniciado el enraizamiento y aclimatación de estas líneas.

Tabla 2. Resultados del establecimiento de líneas axilares de alcornoque y encina en la Universidad de Huelva

Selección	Edad	Especie	Genotipos abordados	Genotipos implantados	Genotipos en multiplicación
PE07-RNM-03108	10-12 años	<i>Q. suber</i>	14	12 (86%)	12 (86%)
		<i>Q. ilex</i>	16	3 (19%)	2 (12%)
SRC-UHU	3-4 años	<i>Q. suber</i>	17	14 (82%)	4 (23%)
		<i>Q. ilex</i>	15	7 (46%)	1 (7%)
Total		<i>Q. suber</i>	31	26 (84%)	16 (52%)
		<i>Q. ilex</i>	31	10 (32%)	3 (10%)

En TRAGSA, 28 genotipos de los 40 abordados se consideran estables en el momento de escribir este trabajo (70%); 9 están en estabilización y 3 se han perdido debido a endófitos. Las mejores proliferaciones se consiguen cultivando en GD con BA 0,1 mg/L ó BA 0,2 mg/L + ANA 0,05 mg/L, según el genotipo, y posterior elongación en medio semisólido MS 1/2N (Figura 5A). El dipping en AIB 0,5 g/L seguido de 1w de oscuridad en medio GD semisólido 20 g/L de sacarosa, y posterior paso a vermiculita en condiciones fotoautotróficas durante 7w ha demostrado ser el sistema más eficaz de enraizamiento (hasta el 42% en algunos genotipos) (Figura 5B). El número de plantas aclimatadas es aún reducido, siendo en este sistema de producción, el principal cuello de botella (Figura 5C).



Figura 6. Brotes elongados de alcornoque listos para el enraizamiento (A); brotes enraizados en vermiculita a las 8w de iniciado el enraizamiento (B); ramets aclimatados a las 16 w.

Micropropagación de los genotipos juveniles de encina mediante cultivo de yemas axilares: En el IIAG, en estos primeros 18 meses del programa, se han introducido *in vitro* 22 de los 24 genotipos asignados al IIAG para su micropropagación (92%), si bien por ahora solo se han conseguido estabilizar los cultivos de 6 genotipos (27,3%) (Tabla 3; Figura 7). En la Universidad de Huelva, se han podido establecer en cultivo 10 de los 31 genotipos abordados (32%) pero sólo 3

líneas se consideran estables en este momento (10%) (Tabla 2). El enraizamiento y aclimatación de ramets de encina está aún en fase de desarrollo.

Tabla 3. Resultados del establecimiento de cultivos de brotes axilares a partir de encinas juveniles en el ILAG.

Selección	Edad	Genotipos abordados	Genotipos establecidos	Genotipos en multiplicación
RESECCA	4-5 años	12	12 (100%)	2 (16,7%)
UnEx	10-12 años	10	10 (100%)	4 (40%)
Total		22	22 (100%)	6 (27,3%)

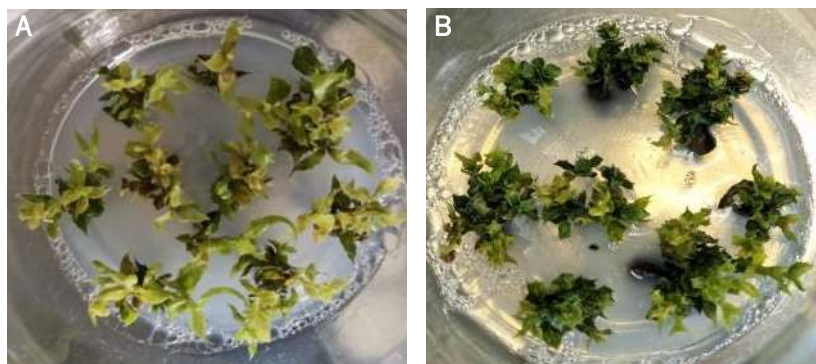


Figura 7. Brotes axilares en proliferación establecidos por el ILAG a partir de genotipos juveniles de encina. (A) selección UnEx y (B) selección RESECCA.

Crioconservación de líneas embriogénicas: en los primeros 18 meses del programa se han crioconservado un total de 33 líneas embriogénicas de alcornoque, 14 de origen adulto y 19 de origen juvenil. A fin de confirmar la idoneidad de este procedimiento para la conservación a largo plazo de las líneas, un mes después de la crioconservación de cada línea se retiraron 3 viales para determinar el porcentaje de supervivencia y de recuperación embriogénica. En 94% (31 de 33) de las líneas las tasas de ambos parámetros estuvieron por encima del 50%, oscilando entre el 63,33-100 % según la línea (Figura 8). Únicamente, en dos líneas, una de origen adulto y otra de origen juvenil, los porcentajes fueron inferiores al 50%, pero suficientes para conservarlas a largo plazo.

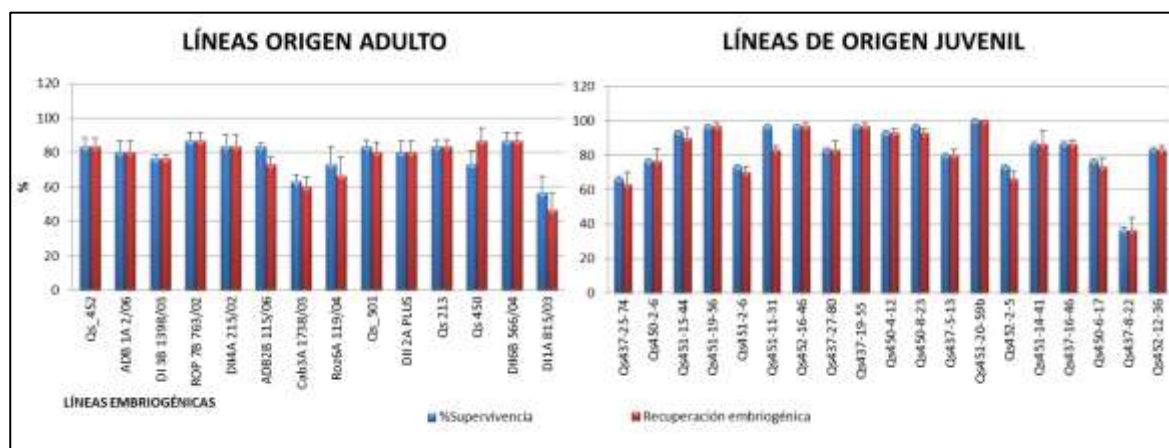


Figura 8. Porcentajes de supervivencia y recuperación embriogénica obtenidos en líneas embriogénicas de origen adulto y juvenil de alcornoque después de un mes en NL y 8 semanas en medio de proliferación.

Aunque en un primer momento, los explantos recuperados de NL aparentan estar totalmente necrosados, después de 2-3 semanas de cultivo en medio de proliferación se observan los primeros signos de recuperación, y las células embriogénicas supervivientes comienzan a proliferar para finalmente desarrollar nuevos ES (Figura 9).

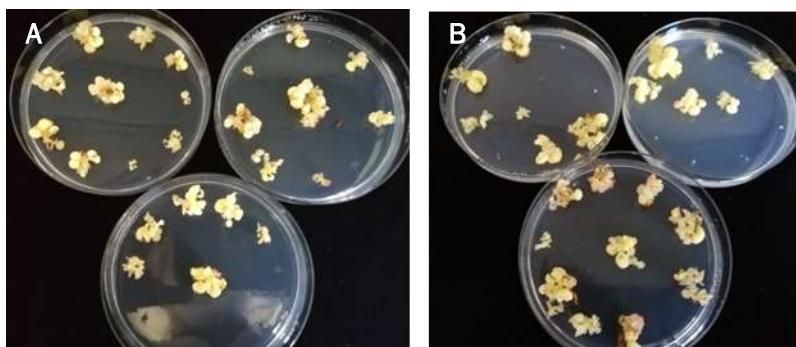


Figura 9. Proliferación de embriones somáticos de alcornoque de origen adulto (A) y juvenil (B) que han sido crioconservados en NL durante un mes, y tras 8 semanas de crecimiento en medio de proliferación y en condiciones de crecimiento estándar.

5. Discusión

La propagación vegetativa, nos permite capturar aquellas características deseadas que no son heredadas de manera eficiente por vía sexual, lo que ofrece grandes ventajas en mejora genética (HERNÁNDEZ et al., 2011). En los árboles, la capacidad de propagación vegetativa se pierde con la edad, pero en el caso del alcornoque, la embriogénesis somática nos permite clonar árboles adultos, usando un protocolo eficaz para la regeneración de plantas a partir de hojas (HERNÁNDEZ et al., 2011), si bien el éxito del proceso está condicionado por el genotipo. La aplicación de este protocolo en este trabajo nos ha permitido la clonación de alcornoques adultos tolerantes a *P. cinnamomi* y/o sequía, produciendo lotes de plantas idénticas que permiten la conservación de este valioso material genético en bancos clonales y su evaluación en ensayos con suficiente número de repeticiones por genotipo.

En el caso de la encina, la clonación de árboles adultos por embriogénesis somática a partir de tejidos florales como los amentos (BLASCO et al., 2013) o bellotas inmaduras (BARRA-JIMÉNEZ et al., 2014) está aún en fase de desarrollo. Al bajo porcentaje en el éxito de la inducción, se suma la dificultad de recolectar bellotas en el estado de desarrollo adecuado. Una alternativa recientemente desarrollada para la inducción de embriogénesis somática en árboles adultos es utilizar cultivos de brotes *in vitro* como fuente de explantos iniciales (MARTÍNEZ, et al., 2019). Los cultivos de brotes axilares producen explantos uniformes y garantizan un suministro ilimitado durante todo el año. Adicionalmente, los sucesivos subcultivos en medio con citoquininas producen cierto rejuvenecimiento que podría mejorar la capacidad embriogénica de estos cultivos (WENDLING et al., 2014). Los cultivos de brotes axilares se han utilizado con éxito para inducir embriones somáticos en explantos de ápices y hojas de *Q. robur* (SAN JOSÉ et al., 2010), *Q. alba* (CORREDOIRA et al., 2012), *Q. bicolor* (MALLÓN et al., 2013) y *Q. rubra* (MARTÍNEZ et al., 2015).

El establecimiento *in vitro* de cultivos de yemas axilares a partir de la brotación forzada de plantas juveniles en condiciones controladas, se ha empleado con éxito en varias especies de *Quercus* (VIEITEZ et al., 2009). En nuestro trabajo este sistema ha permitido el establecimiento de los cultivos de encina y alcornoque a partir de brinzales de entre 4 y 12 años, si bien el cultivo y estabilización posterior ha tenido diferente éxito. Las diferencias en los porcentajes de captura de genotipos entre TRAGSA y UHu en alcornoque, y entre IIAG y UHu en encina puede deberse a la diferente edad u origen de las plantas establecidas en cada organismo. En el caso del alcornoque, todas las plantas establecidas en TRAGSA tenían una edad de 4-5 años, mientras que en la UHu,

una de las colecciones tenía una edad de 12 años. En el caso de las encinas, sin embargo, tanto el IIAG como UHu establecían colecciones de 4-5 años y de 10-12 años, por lo que las diferencias en este caso pueden deberse al diferente origen de las colecciones, y al efecto del genotipo de la planta donante. Estas diferencias ya se han puesto de manifiesto en anteriores trabajos (GOMES et al., 2010; RATHORE et al., 2015; MARTÍNEZ et al., 2020), y de hecho MARTÍNEZ (2021) encuentra que en encinas, la edad de la planta donante parece afectar menos al establecimiento que en otras especies de *Quercus*, estando la respuesta al cultivo más afectada por el genotipo de la planta donante que por la edad. El efecto del genotipo afectaría también a la tasa de proliferación y al porcentaje de enraizamiento que fue menor en los genotipos de la colección de la UHu. GOMES et al. (2010) señalan que esta diferente respuesta puede deberse a diferentes niveles endógenos de regulares de crecimiento o diferentes niveles de sensibilidad a los reguladores aportados de manera exógena. Los porcentajes de enraizamiento y aclimatación conseguidos a partir del cultivo de yemas axilares, en cualquier caso, sigue siendo muy bajo, especialmente en el caso de la encina.

La embriogénesis somática a partir de hojas de plantas jóvenes de alcornoque (UV), ha producido en este trabajo unos porcentajes similares en cuanto a captura y estabilización de genotipos, que el cultivo de yemas axilares de plantas de la misma colección (TRAGSA) (77% en UV frente al 70% de TRAGSA). Sin embargo, la embriogénesis somática, a pesar de las complicaciones de la aclimatación, está permitiendo la producción de planta aclimatada a partir del 57% de los genotipos, mientras que el cultivo de yemas axilares sólo ha conseguido la aclimatación de unas pocas plantas, sin conseguir producción regular de ninguno de los genotipos. Este mejor comportamiento de los ES en la aclimatación, puede deberse al tipo de sistema radicular que se genera. Mientras que las yemas axilares presentan raíces adventicias alrededor del brote, los ES presentan una raíz pivotante similar a la raíz desarrollada por una bellota en germinación (MARTÍNEZ, 2021). Por este motivo, aunque el cultivo de yemas axilares es un sistema más simple desde el punto de vista técnico, el éxito del resultado puede hacer recomendable usar la embriogénesis somática como sistema de clonación en estas especies.

La crioconservación es un procedimiento adecuado para la conservación a largo plazo de las líneas embriogénicas de alcornoque generadas tanto a partir de árboles escape adultos, como de brinzales tolerantes. La combinación de embriogénesis somática y crioconservación es especialmente útil en la selección de genotipos superiores, ya que permite el almacenamiento de las líneas embriogénicas generadas en los diferentes ensayos de un programa de mejora mientras son evaluadas sus características, bien a nivel de laboratorio o bien en el campo (CORREDOIRA et al., 2017). Además, la crioconservación facilita el manejo de las líneas embriogénicas reduciendo costes y tiempo empleado en ello, limitando así el riesgo de aparición de variación somaclonal o contaminación. Para almacenar el material vegetal en NL, en general, es necesario reducir su contenido de agua y así evitar los efectos irreversibles de la formación de hielo intracelular durante la congelación (PANIS & LAMBARDI, 2005). En este caso se ha aplicado el método de la vitrificación siguiendo el protocolo previamente aplicado en la crioconservación de líneas embriogénicas de alcornoque (VALLADARES et al., 2004).

6. Conclusiones

La micropropagación es una herramienta indispensable en el Programa de Mejora en curso, que permite la producción de copias suficientes de cada genotipo para su evaluación por tolerancia y para el establecimiento de poblaciones de mejora. Con alcornoque, ya es posible usar planta producida biotecnológicamente directamente en plantaciones (silvicultura multivarietal). En el caso de la encina, es aún necesario seguir profundizando en el desarrollo de los protocolos de multiplicación, enraizamiento y aclimatación para asegurar una producción eficiente de planta, puesto que los resultados están muy afectados por el genotipo y la edad.

La crioconservación mediante el método de la vitrificación es un procedimiento simple y eficiente que permite el desarrollo de un banco de germoplasma a gran escala y largo plazo con un gran número de genotipos seleccionados de alcornoque, al mismo tiempo que nos permitirá ensayar los clones convenientemente en campo, y rescatar posteriormente los genotipos más valiosos para su producción biotecnológica y su registro como materiales de base, una vez concluida su evaluación.

7. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el MITECO a través del Programa Nacional de Desarrollo Rural 2014–2020, dentro de la submedida 15.2, de apoyo al fomento y la conservación de los recursos genéticos forestales, que dispone de una cofinanciación de fondos FEADER al 75%. Agradecemos especialmente a la Subdirección General de Política Forestal y Lucha contra la Desertificación, su interés y apuesta por la biotecnología como sistema de producción de materiales forestales de reproducción.

A los técnicos que han prestado su asistencia a los trabajos: Marta Marquez Nogueira, Carlos del Campo Villar, y Ángel Murcia Piqueras.

8. Bibliografía

ALÍA, R.; ALBA, N.; AGÚNDEZ, D.; IGLESIAS, S. 2005. Manual para la comercialización y producción de semillas y plantas forestales. Material de base y de reproducción. Serie Forestal. DGB. 382 páginas. Madrid.

BARRA-JIMÉNEZ, A.; BLASCO, M.; RUIZ-GALEA, M.; CELESTINO, C.; ALEGRE, J.; ARRILLAGA, I.; TORIBIO, M. 2014. Cloning mature holm oak trees by somatic embryogenesis. *Trees* 28(3), 657-667.

BLASCO, M.; BARRA, A.; BRISA, C.; CORREDOIRA, E.; SEGURA, J.; TORIBIO, M.; ARRILLAGA, I. 2013. Somatic embryogenesis in holm oak male catkins. *Plant Growth Regul.* 71, 261–270.

CORREDOIRA, E.; SAN-JOSÉ, M.C.; VIEITEZ, A.M. 2012. Induction of somatic embryogenesis from different explants of shoot cultures derived from young *Quercus alba* trees. *Trees* 26(3), 881-891.

CORREDOIRA, E.; MARTÍNEZ, M.T.; SAN-JOSÉ, M.C.; BALLESTER, A. 2017. Conservation of hardwood forest species. En: Ahuja, M.R.; Jain, S.M. (eds.): Biodiversity and Conservation of Woody Plants. Vol. 17. Páginas 421-453. Springer International Publishing.

GARCÍA MARTÍNEZ, J.J. 2016. Micropropagación de *Quercus suber* L. y resistencia/tolerancia *in vitro* al patógeno *Phytophthora cinnamomi* Rands. Fases iniciales de la micropropagación de *Q. ilex* L. Tesis Doctoral. Universidad de Huelva.

GRESSHOFF, P. M.; DOY, C. H. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta* 107, 161-170

GOMES, F.; SIMÕES, M.; LOPEZ, M.L.; CANHOTO, J.M. 2010. Effect of plant growth regulatros and genotype on the micropropagation of adult trees of *Arbutus unedo* L. (Strawberry tree). *New Biotechnology* 27(6), 882-892.

HERNÁNDEZ, I.; CUENCA, B.; CARNEROS, E.; ALONSO-BLAZQUEZ, N.; RUIZ, M.; CELESTINO, C.; OCAÑA, I.; ALEGRE, J.; TORIBIO, M. 2011. Applications of plant regeneration of selected cork oak trees by somatic embryogenesis to implement multivarietal forestry for cork oak production. *Tree For. Sci. Biotech.* 5, 19-26.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30, 421-427.

MALLÓN, R.; MARTÍNEZ, M.T.; CORREDOIRA, E.; VIEITEZ, A.M. 2013. The positive effect of arabinogalactan on induction of somatic embryogenesis in *Quercus bicolor* followed by embryo maturation and plant regeneration. *Trees* 27(5), 1285-1296.

MARTÍNEZ, M.T.; VIEITEZ, A.M.; CORREDOIRA, E. 2015. Improved secondary embryo production in *Quercus alba* and *Q. rubra* by activated charcoal, silver thiosulphate and sucrose: Influence of embryogenic explant used for subculture. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 121 (3), 531-546.

MARTÍNEZ, M. T.; SAN-JOSÉ, M. C.; VIEITEZ, A.M.; CERNADAS, M. J.; BALLESTER, A.; CORREDOIRA, E. 2017. Propagation of mature *Quercus ilex* L. (holm oak) trees by somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 131, 321-330.

MARTÍNEZ, M.T.; SAN-JOSÉ, M.C.; ARRILLAGA, I.; CANO, v.; MORCILLO, M.; CERNADAS, M. J.; CORREDOIRA, E. 2019. Holm Oak Somatic Embryogenesis: Current Status and Future Perspectives. *Front Plant Sci.* 10, 239-253.

MARTÍNEZ, M.T.; VIEITEZ, F.J.; SOLLA, A.; TAPIAS, R.; RAMIREZ-MARTÍN, N.; CORREDOIRA, E. 2020. Vegetative propagation of *Phytophthora cinnamomi*-tolerant holm oak genotypes by axillary budding and somatic embryogenesis. *Forest* 11, 841-863.

MARTÍNEZ, M.T. 2021. Micropropagation of holm oak by axillary budding and somatic embryogenesis. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plant.* 15, 473-497.

PANIS, B. y LAMBARDI, M. 2005. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). En: Ruane, J.; Sonnino, A. (eds.): The role of biotechnology for the characterization and conservation of crop, forest, animal and fishery genetic resources in developing countries. Páginas 61–78. FAO. Turin.

RATHORE, M.S.; YADAV, S.; YADAV, P.; KHENI, J.; JHA, B. 2015. Micropropagation of elite genotype of *Jatropha curcas* L. through enhance axillary bud proliferation and ex vitro rooting. *Biomass and Bioenergy* 83, 501-510.

RUIZ-GOMEZ, F.J.; PÉREZ-DE-LUQUE, A.; NAVARRO-CERRILLO, R. M. 2019. The involvement of *Phytophthora* root rot and drought stress in holm oak decline: from ecophysiology to microbiome influence. *Current Forestry Rep.* 5(4), 251-266.

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.

SAN JOSÉ, M.C.; CORREDOIRA, E.; MARTÍNEZ, M.T.; VIDAL, N.; VALLADARES, S.; MALLÓN, R.; VIEITEZ, A.M. 2010. Shoot apex explants for induction of somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* L. trees. *Plant Cell Rep.* 29(6), 661-671.

SCHENK, R.U.; HILDEBRAND, A.C. 1972. Medium and techniques for induction of growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. *Can. J. Bot.* 50, 199–204.

TORIBIO, M.; CELESTINO, C.; MOLINAS, M. 2005. Cork oak, *Quercus suber* L. En: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K. (eds): Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Páginas 445-457. Springer. Netherlands.

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.; CORREDORIORA, E.; BALLESTER, A.; MUÑOZ, F.; DURÁN J.; IBARRA, M. 2009. *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Q. bicolor* and *Q. rubra*. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 98(2), 135-145.

WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. 2014. Maturation and related aspects in clonal forestry—part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. *New Forests* 45(4), 473-486.