



CONAMA10
CONGRESO NACIONAL
DEL MEDIO AMBIENTE

COMUNICACIÓN TÉCNICA

Clonación de los alcornoques singulares de la Comunidad de Madrid

Autor: Lucía Turnes Garabal

Institución: IMIDRA

e-mail: lucia.turnes@madrid.org

Otros Autores: Mar Ruiz (IMIDRA), Alfredo Cuevas (IMIDRA), Celina Villareal (IMIDRA), Araceli Hernández (IMIDRA), Gabriel García (IMIDRA), Cristina Celestino (IMIDRA), Jesús Alegre (IMIDRA), Mariano Toribio (IMIDRA), David Medel (IMIDRA).



RESUMEN

Las técnicas de propagación vegetativa se emplean con diversas finalidades, pudiendo ser una de ellas la conservación de la biodiversidad mediante la clonación de genotipos de interés. Dichas técnicas se basan en dos posibles vías de regeneración clonal de plantas: la vía organogénica y la vía embriogénica. En esta presentación se describe la aplicación de un protocolo de regeneración por inducción de embriogénesis somática en hojas de alcornoques adultos. Para ello se ha abordado la clonación de los nueve alcornoques que están recogidos en el Catálogo de Árboles Singulares de la Comunidad de Madrid. La inducción de embriogénesis somática se ha llevado a cabo en hojas en expansión, procedentes de brotes epicórmicos obtenidos en trozos de ramas de la copa de dichos árboles. Se han logrado establecer líneas embriogénicas en ocho de los nueve genotipos, por lo que un 89% de los genotipos fueron reactivos al primer intento de inducción. La amplificación de las líneas embriogénicas, maduración de embriones y germinación de los mismos está en curso. Hasta el momento se han obtenido plantas clónicas de los árboles Dehesa de Valgallego y La Corchera.

Palabras Clave: Biotecnología forestal, conservación de recursos genéticos, cultivo *in vitro*, embriogénesis somática, micropropagación, propagación vegetativa

INTRODUCCIÓN

Actualmente la conservación de la biodiversidad es una tarea impostergable. En los últimos años se ha debatido mucho sobre su urgencia y, paralelamente a la reflexión desde el ámbito científico, se ha ido creando un creciente interés en la ciudadanía.

Se trata de una labor ingente y su puesta en práctica requiere la suma de logros a nivel local, como puede ser la conservación de recursos fitogenéticos valiosos. Los árboles singulares son ejemplares que por su rareza, excelencia de porte, edad, tamaño, significación histórica, cultural o científica, constituyen un patrimonio merecedor de especial protección.

Desde un punto de vista genético, la conservación de la biodiversidad supone la conservación de la variabilidad genética presente en las poblaciones. La acción más importante para conservar esta variabilidad es la conservación *in situ* de genes y alelos, en frecuencias representativas de las que existen en las poblaciones naturales. Pero también se acomete la conservación *ex situ* de genes y genotipos, utilizando en el primer caso la propagación sexual, y en el segundo aplicando técnicas de propagación vegetativa. A los medios y estrategias tradicionales para conservar la biodiversidad se unen en los últimos años toda una serie de herramientas basadas en la biología molecular y celular, comprendidas en el amplio conjunto de la biotecnología (Ruane y Sonio, 2006)

La biotecnología forestal actualmente apoya a las actividades clásicas de la silvicultura para conseguir dos objetivos básicos de la gestión forestal: mantenimiento de la diversidad en los bosques naturales, para la conservación y la utilización de los recursos genéticos, y mejora genética que se añade a la gestión cultural intensiva en plantaciones forestales. También ofrece herramientas específicas para la conservación *ex situ*. La conservación de recursos genéticos forestales se apoya en el desarrollo de marcadores, fundamentalmente de ADN, como medio para conocer la amplitud y la distribución de la variabilidad genética a conservar. También en la crioconservación y en la regeneración de plantas, como medios para la conservación *ex situ* y para la clonación de genotipos selectos (Toribio y Celestino, 2000; El-Kassaby, 2004).

La Comunidad de Madrid aprobó mediante el Decreto 18/1992, de 26 de marzo, el Catálogo Regional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres, creando la categoría de *Árboles Singulares*. El Catálogo Regional incluye dicha categoría, que se crea al amparo de lo dispuesto en el artículo 7.2 de la Ley 2/1991 (Ley para la Protección y Regulación de la Fauna y Flora Silvestres en la Comunidad de Madrid), para recoger los ejemplares de flora con características extraordinarias que, por su rareza, excelencia de porte, edad, tamaño, significación histórica, cultura o valor científico, constituyen un patrimonio merecedor de especial protección por parte de la Administración, protección que exige medidas específicas. Entre ellas, el Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), ha acometido un proyecto para conservar estos genotipos que forman parte del patrimonio genético forestal de la Comunidad de Madrid. Entre los árboles incluidos en dicho Catálogo, actualmente se encuentran nueve alcornoques, cuya localización y descripción se expone en el trabajo de Cantero Desmartines y López Lillo (1995).

El alcornoque (*Quercus suber* L.) es una de las especies arbóreas más importantes de ecosistema mediterráneo. Además de su gran valor social y ecológico, tiene un valor económico indudable. Su producto principal es el corcho, pero además produce bellotas utilizadas en la alimentación del cerdo ibérico, y micorriza con diferentes especies de hongos comestibles. Actualmente también se está investigando las posibilidades de aplicación de diferentes sustancias producidas por esta especie, que inhiben el crecimiento de líneas celulares cancerosas (Hernández et al, 2010).

La vía de regeneración clonal de plantas más adecuada para el sector forestal, que permite implementar la silvicultura multivarietal, es la embriogénesis somática (Celestino et al, 2005). En el caso del alcornoque, se ha conseguido desarrollar un protocolo para inducir embriogénesis somática en hojas de ejemplares adultos (Hernández et al, 2001), lo que ha permitido clonar árboles seleccionados (Hernández et al, 2003). El comportamiento de las plantas somáticas de alcornoque en plantaciones experimentales muestra que, aunque al principio tienen un crecimiento menor que las procedentes de semilla, paulatinamente tienden a igualarlo (Celestino et al, 2009).

El protocolo se ha aplicado a la conservación de genotipos singulares. En concreto se ha clonado para su conservación, tanto *in situ* como *ex situ*, un alcornoque de la localidad de Alfavaret que presenta un genoma muy particular (Hernández et al, 2008; Lorenzo et al, 2009). Actualmente la empresa TRAGSA está comenzando a utilizar esta metodología para desarrollar variedades selectas de alcornoque, a fin de poder implementar la silvicultura multivarietal en plantaciones (Hernández et al, 2010).

En esta comunicación se describe cómo se ha aplicado con éxito la metodología más novedosa en biotecnología forestal para la regeneración de alcornoques singulares de la Comunidad de Madrid, esto es, la micropropagación *in vitro* y vía embriogénica para la regeneración clonal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de explantos iniciales

Los alcornoques singulares y las fechas de toma de muestras se detallan en la Tabla 1. De cada árbol se cortaron al menos tres ramas de al menos tres posiciones diferentes, según la accesibilidad. El diámetro máximo de corte fue de 4 cm aproximadamente. Se eliminaron todas las hojas y ramillas. Se cortó cada rama en segmentos de 15-20 cm de largo, y entre 4 y 0,5 cm de diámetro, hasta tener unos 30 segmentos por árbol. Se almacenaron inmediatamente en bolsas de plástico bien cerradas para evitar la desecación.

En laboratorio los segmentos se lavaron y se sumergieron en solución fungicida compuesta por 1 g l⁻¹ de CAPTAN-R[®] y 1 g l⁻¹ de BENOAGREX[®] durante 10 minutos. Se escurrieron e insertaron en bandejas con perlita húmeda y se pasaron a cámara de alta humedad (80-90 %HR) para brotación. Durante el periodo de brotación se trataron las estacas con un rociado semanal de fungicida, alternando cíclicamente, Captazel[®], Antracol[®], Beltanol-L[®] y Previcur[®]. Se almacenó en frío el material sobrante de cada árbol.

Introducción in vitro

De los brotes epicórmicos formados se recogieron hojas en expansión de tamaño no superior a 1,5 cm. En cabina de flujo laminar, se esterilizaron con etanol (70%) durante 30 s y a continuación con lejía comercial diluida al 10% con unas gotas de Tween® 20 durante 10 min. Posteriormente se enjugaron tres veces con agua destilada estéril.

De cada árbol se introdujeron en cultivo *in vitro*, como explantos iniciales, aproximadamente 150 hojas. Se cultivaron en placas Petri de 60 mm de diámetro con 10 ml de medio de preacondicionamiento, a razón de tres hojas por placa, disponiéndolas con el envés en contacto con el medio. Éste se compone de los macronutrientes de Gamborg (1966, PRL-4-C) diluidos a la mitad, micronutrientes, vitaminas y Fe-EDTA de Murashige y Skoog (1962), 10 g l⁻¹ de sacarosa y 6 g l⁻¹ de agar (Plantagar S1000; B&V). El medio de preacondicionamiento no incluye reguladores de crecimiento. Las placas se sellaron con Parafilm® y se mantuvieron durante 7 días en oscuridad a 25±2 °C.

Todos los medios de cultivo se ajustaron a pH 5,75 antes de añadir el agar, y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 30 min.

Inducción de embriogénesis somática

Consta de tres fases. En la fase primaria los explantos se mantuvieron en medio con los macronutrientes de Schenk and Hildebrandt (1972), micronutrientes, vitaminas y Fe-EDTA de Murashige and Skoog (1962), 30 g l⁻¹ de sacarosa y 6 g l⁻¹ de agar (Plantagar S1000; B&V), suplementado con 50 µM de ácido 1-naftalenacético (ANA) y 10 µM de 6-bencilaminopurina (BAP). Los cultivos se mantuvieron en cámara de cultivo a 25±2 °C y en oscuridad durante 30 días.

En la fase secundaria se mantuvieron los cultivos en el mismo medio basal, pero suplementado con 0,5 µM de ANA y 0,5 µM de BAP, en cámara de cultivo a 25±2 °C y fotoperiodo de 16h de luz (tubos fluorescentes de SYLVANA GRO-LUX® y PHILIPS cool-white, 120-180 µmol m⁻² seg⁻¹) durante 30 días.

En la fase de manifestación se cultivaron en el mismo medio basal, pero sin reguladores de crecimiento, y en las mismas condiciones ambientales de la fase secundaria, durante 45 días.

Fase de proliferación recurrente

Los embriones y masas de embriones obtenidos a partir de los explantos iniciales se aislaron de los mismos para su proliferación recurrente. La proliferación de las líneas embriogénicas se llevó a cabo en potitos de 100 ml de capacidad (SIGMA, V8630) con el mismo medio de cultivo de la fase de manifestación, y dispuestos en las mismas condiciones ambientales. El subcultivo de las masas de embriones se realizó cada dos semanas.

Maduración de los embriones somáticos

Para este trabajo no se aplicaron tratamientos específicos de maduración. En cada subcultivo de las masas de embriones en fase recurrente, se seleccionaron embriones que mostraban maduración espontánea, caracterizada fundamentalmente por el desarrollo apropiado del eje y los cotiledones y sin signos de embriogénesis secundaria.

Dichos embriones aislados se sometieron a un tratamiento de estratificación, que consistió en el almacenamiento en potito (con el mismo medio de cultivo de las fases de manifestación y recurrente), en cámara frigorífica a 4°C, en oscuridad, durante 2 meses.

Germinación

Los embriones somáticos se introdujeron en recipientes ECO2 BOX green filter (DUCHEFA, E1654) con 300 ml del mismo medio basal de las fases de inducción y proliferación, pero suplementado con 0,11 µM de BAP y 0,25 µM de ácido 3-indolbutírico (AIB), y se mantuvieron a 25±2 °C y fotoperiodo de 16h de luz hasta su germinación completa, esto es, emisión de raíz y tallo.

Aclimatación de las plántulas somáticas

Los embriones que en la etapa anterior desarrollaron una raíz de aproximadamente 4 cm y un tallo más o menos desarrollado, se transfirieron a contenedor forestal con un sustrato compuesto en un 40% por turba (Turba Kekkilä 50:50), un 40% de fibra de coco (Coco Peat®) y un 20% de perlita expandida (A13), con el añadido de 3 g l⁻¹ de abono de liberación lenta (Scotts Osmocote® Pro 18:9:10) Se mantuvieron en cámara de aclimatación con alta humedad (70-80% HR) a 25±2 °C y fotoperiodo de 16 horas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de explantos iniciales

En las estacas dispuestas en la cámara de alta humedad aparecieron los primeros brotes epicórmicos aproximadamente al cabo de dos semanas, de los que se recogieron hojas en expansión (Fig. 1). El tiempo de brotación de las estacas es dependiente del genotipo. Se completó la recogida de hojas en expansión en 16 días para Romanillos II y en 37 días en el caso del ejemplar de Arroyo del Fresno. En el resto de árboles el tiempo necesario para la obtención de los explantos fue de unos 18 días. Se consiguieron brotes epicórmicos en la totalidad de los árboles muestreados, a pesar de haberse recogido las muestras en diferentes fechas, entre enero y mayo (Tabla 1). La buena capacidad de emisión de brotes epicórmicos de las estacas de alcornoque se ha reseñado anteriormente (Hernández et al, 2003).



Figura 1. Trozos de ramas de alcornoque emitiendo brotes epicórmicos en cámara de ambiente controlado

Tabla 1. Localización de los alcornoques singulares de la Comunidad de Madrid y fecha de las tomas de muestras

Denominación	Municipio	Toma de muestras
Alcornoque de la Dehesa de Valgallego	Torrelaguna	21 Enero 2010
Alcornoque de Romanillos I	Boadilla del Monte	24 Febrero 2010
Alcornoque de Romanillos II	Boadilla del Monte	24 Febrero 2010
Alcornoque de El Pardo I	Madrid	8 Febrero 2010
Alcornoque de El Pardo II	Madrid	8 Febrero 2010
Alcornoque de calle Arroyo del Fresno	Madrid	8 Febrero 2010
Alcornoque de Rozas del Puerto Real	Rozas del Puerto Real	2 Marzo 2010
Alcornoque de La Corchera	Boadilla del Monte	24 Febrero 2010
Alcornoque de las Casiruelas	Manzanares el Real	4 Mayo 2010

Introducción in vitro

Durante la introducción de los explantos *in vitro* se perdió una parte de los mismos por contaminación. La frecuencia media de hojas contaminadas fue del 10%, variando con los genotipos entre la ausencia de contaminación que mostraron tanto el Arroyo Fresno como La Corchera, y el 24% del genotipo Dehesa de Valgallego. Sin embargo, en la mayor parte de los genotipos la contaminación fue reducida (Tabla 2). El protocolo establecido para la esterilización en superficie de las hojas en expansión de alcornoque es muy eficiente, pues en la mayoría de los casos publicados la frecuencia de hojas contaminadas es baja, variando con el genotipo, la fecha de recogida y la procedencia del material (Hernández et al 2001, 2003, 2009).

Tabla 2. Frecuencia de hojas contaminadas y obtención de líneas embriogénicas, al cultivar *in vitro* hojas procedentes de brotes epicórmicos de los alcornoques singulares de la Comunidad de Madrid

Genotipo	Nº de hojas en cultivo	Hojas contaminadas (%)	Líneas embriogénicas
Dehesa de Valgallego	204	24	si
El Pardo I	151	9	si
El Pardo II	191	13	si
Arroyo Fresno	144	0	si
Romanillos I	120	3	si
Romanillos II	204	4	si
La Corchera	266	0	si
Rozas Puerto Real	75	4	si
Casiruelas	389	2	no
TOTAL	1744	10	--

Inducción de embriogénesis somática

Al igual que en anteriores trabajos (Hernández et al, 2001), la aparición de embriones somáticos tuvo lugar cuando las hojas se subcultivaron en el medio de expresión, no mostrando un patrón determinado en la forma en que los embriones surgieron (Fig. 2). Trabajos anteriores mostraron la influencia del momento de toma de muestras sobre la capacidad embriogénica (Hernández et al, 2003). En el presente estudio todos los genotipos respondieron al primer intento de inducción, generando líneas embriogénicas, excepto el Casiruelas (Tabla 2). Esto supone que un 89% de los genotipos fueron reactivos al primer intento, cifra prácticamente igual a la obtenida en un trabajo operativo anterior (86%), en el que se clonaron 44 alcornoques seleccionados en Extremadura por su calidad y productividad de corcho (Hernández et al,



2009). La frecuencia media de hojas que dieron embriogénesis somática fue del 10%, variando con los genotipos entre el 4% del Dehesa de Valgallego y el 16% del Romanillos II. Estos valores fueron similares a los publicados anteriormente cuando se trabajó con un número similar de genotipos (Hernández et al, 2003), y ligeramente inferiores a los reseñados cuando se consideró un mayor número de genotipos (Hernández et al, 2009).

Figura 2. Hoja cultivada *in vitro* mostrando la formación de embriones somáticos

Fase de proliferación recurrente

El patrón de desarrollo de los embriones somáticos aislados de los explantos iniciales fue similar al observado en anteriores trabajos. La multiplicación de los embriones somáticos se obtiene por formación de embriones secundarios, generándose un proceso de proliferación recurrente (Hernández et al, 2003, 2010). Se consideró que las líneas embriogénicas estaban establecidas cuando hubo 10 potitos con material en proliferación recurrente para cada uno de los árboles singulares (Fig. 3)

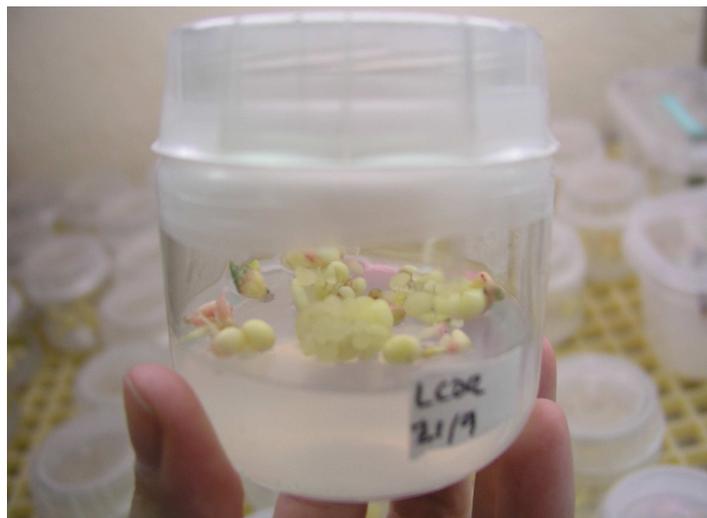


Figura 3. Potito con embriones somáticos en proliferación recurrente

Germinación y aclimatación



La capacidad de proliferación y de maduración espontánea de cada genotipo fue muy diferente, lo que repercutió en el número de embriones disponibles para germinar (Tabla 3). Hasta el momento no se han logrado aislar embriones maduros de las líneas embriogénicas El Pardo II y Arroyo Fresno. La germinación de los embriones mostró el patrón habitual de desequilibrio raíz-tallo, típico del cultivo en medio con reguladores de crecimiento (Fig. 4). La frecuencia media de germinación de los embriones somáticos fue del 52%, prácticamente idéntica a la obtenida con embriones somáticos de 24 genotipos selectos de procedencias extremeñas (Hernández et al, 2009). Al igual que en dicho estudio las frecuencias de germinación variaron con el genotipo, entre el 29% de El Pardo I y el 72% de La Corchera (Tabla 3).

Figura 4. Embrión somático germinado

Tabla 3. Frecuencia de germinación de los embriones somáticos y de aclimatación de las plántulas somáticas obtenidas de los alcornoques singulares de la Comunidad de Madrid.

Genotipo	Nº de embriones somáticos	Embriones germinados (%)	Plantas aclimatadas %
Dehesa de Valgallego	44	50	18
El Pardo I	55	29	0
El Pardo II	--	--	--
Arroyo Fresno	--	--	--
Romanillos I	1	100	0
Romanillos II	39	67	0
La Corchera	29	72	14
Rozas Puerto Real	8	62	0
TOTAL	176	52	8



La supervivencia media de las plantas producidas fue del 8%. Este valor es la mitad del obtenido previamente para plantas generadas a partir de embriones somáticos que maduraron espontáneamente (Hernández et al, 2009). El bajo número de genotipos con el que se está trabajando, y el número limitado de plantas del que se ha dispuesto hasta el momento, pueden ser las razones de esta frecuencia más baja. Como en los parámetros anteriores varió según el genotipo, entre la mortalidad total de las plantas de la mayor parte de los genotipos, y el 18% de supervivencia del genotipo Dehesa de Valgallego (Tabla 3). En el trabajo antes referido, casi la cuarta parte de los genotipos mostraron frecuencias de supervivencia entre el 0 y el 7% (Hernández et al, 2009). Las plantas aclimatadas están creciendo mostrando una morfología normal (Fig. 5).

Figura 5. Plantas somáticas, clónicas del alcornoque La Corchera

CONCLUSIONES

Aunque el proyecto de regeneración clonal de los alcornoques singulares de la Comunidad de Madrid aún está en curso, por el momento se ha logrado la inducción de embriogénesis somática y la obtención de líneas embriogénicas en ocho de ellos. Cabe esperar que en el noveno se pueda lograr la inducción tomando muestras en otro momento.

De las líneas embriogénicas establecidas se están obteniendo embriones capaces de generar plantas somáticas. A día de hoy existe un número de plantas en proceso de aclimatación, con las que se establecerán las oportunas colecciones clonales. El trabajo llevado a cabo confirma nuevamente que la técnica de propagación *in vitro* por vía embriogénica es apropiada para la regeneración clonal del alcornoque.

AGRADECIMIENTOS

La financiación del proyecto FP09-IA05-CLON con el que se están llevando a cabo estos trabajos es propia del IMIDRA y gracias a la colaboración del servicio de Guardería Forestal de la Comunidad de Madrid, Ayuntamientos y la Consejería de Medio Ambiente, Vivienda y Ordenación del territorio.

REFERENCIAS

Cantero Desmartines FJ, López Lillo A (1995) Árboles Singulares de Madrid. Agencia de Medio Ambiente. Comunidad de Madrid 2ª Edición. ISBN: 84-451-1094-2. 789 pp.

Celestino C, Hernández I, Carneros E, López-Vela D, Toribio M (2005) La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. En: Aranda I, Cervera MT, Pardos M (eds.) Ecophysiology: from genes to ecosystems. Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales, 14 (3): 345-357.

Celestino C, Fernández-Guijarro B, Hernández I, López-Vela D, Carneros E, Jiménez J, Cardo L, Alegre J, Toribio M (2009) Growth data from a field trial of *Quercus suber* plants regenerated from mature selected trees and from their half-sib progenies by somatic embryogenesis. Acta Horticulturae (ISHS) 812:493-498

El-Kassaby Y (2004) Feasibility and proposed outline of a global review of forest biotechnology. Forest Genetic Resources Working Paper FGR/77E. Forest Resources Development Service, Forest Resources Division. FAO, Roma.
<http://www.fao.org/docrep/009/aq047e/aq047e00.htm>

Gamborg OL (1966) Aromatic metabolism in plants. II. Enzymes of the shikimate pathway in suspension cultures of plant cells. Can. J. Biochem. 44: 791-799

Hernández I, Celestino C, Martínez I, Manjón J.L., Díez J., Fernández-Guijarro B., Toribio M (2001) Cloning mature cork oak (*Quercus suber* L.) trees by somatic embryogenesis. Melhoramento, 37: 50-57.

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 Reports 21: 765-770.

Hernández I, Celestino C, López-Vela D, Carneros E, Jiménez J, Alegre J, Gil L, Toribio M (2008) Plant regeneration from an endangered valuable cork oak tree by somatic embryogenesis. In: Vázquez J, Pereira H, González-Pérez A (eds.) Suberwood: New challenges for integration of cork oak forest and products. Pgs. 205-212. Universidad de Huelva, Publicaciones. ISBN: 978-84-96826-47-2.

Hernández I, Cuenca B, Carneros E, Alonso N, Ruiz M, Celestino C, Ocaña L, Alegre J, Toribio M (2009) Regeneración clonal de alcornoques selectos mediante embriogénesis somática. 5º Congreso Forestal Español. Montes y Sociedad: Saber qué hacer. Ávila, España. 21-25 Septiembre. Sociedad Española de Ciencias Forestales - Junta de Castilla y León (eds.), documento 5CFE01-268. ISBN: 978-84-936854-6-1.
<http://www.congresoforestal.es/index.php?men=81>

Hernández I, Cuenca B, Carneros E, Alonso-Blázquez N, Ruiz M, Celestino C, Ocaña L, Alegre J, Toribio M (2010) Application of plant regeneration of selected cork oak trees by somatic embryogenesis to implement multivarietal forestry for cork production. Invited review. Tree and Forestry Science and Biotechnology (en prensa).

Lorenzo Z, Burgarella C, López de Heredia U, Lumaret R, Petit RJ, Soto A, Gil L (2009) Relevance of genetics for conservation policies: the case of Minorcan cork oaks. *Annals of Botany* 104: 1069-1076.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497

Ruane J, Sonnino A (eds.) (2006) The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Roma, Italia. ISBN: 92-5-105480-0. 190 pp.
<http://www.fao.org/docrep/009/a0399e/a0399e00.htm>

Schenk RU & Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199-204

Toribio M, Celestino C (2000) El Uso de la Biotecnología en la Conservación de Recursos Genéticos Forestales. En: Gil, L.A. y Alía R. (eds.) *Conservación de Recursos Genéticos Forestales. Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales. Volumen: Fuera de Serie, nº 2*, pp. 249-260.