



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



Conservación de germoplasma de encina (*Quercus ilex*) mediante criobiotecnología

BALLESTEROS, D.^{1,2}, MARTÍNEZ, M.T.³, PRITCHARD, H.W.¹ y CORREDOIRA, E.³

¹ Trait Diversity and Function, Royal Botanic Gardens Kew, Wakehurst Place, Reino Unido.

² Departamento de Botánica y Geología, Universitat de València, España.

³ Misión Biología de Galicia (MBG)-CSIC, España.

emails: daniel.ballesteros@uv.es; elenac@iag.csic.es

Resumen

El grave deterioro experimentado por las poblaciones de encina (*Quercus ilex*) en las últimas décadas como consecuencia, entre otras, del síndrome de la “seca”, ha despertado un gran interés por el desarrollo de métodos criobiotecnológicos para su mejora y conservación. Las herramientas criobiotecnológicas disponibles en la actualidad suponen una ayuda importante en la conservación de recursos fitogenéticos. Entre esas técnicas, destaca la criopreservación o almacenamiento en nitrógeno líquido dado que se considera la fórmula más fiable para el almacenamiento a largo plazo de las especies con semillas recalcitrantes (es decir, intolerantes al desecado y por tanto al almacenado en bancos de semillas convencionales) o las especies que se propagan vegetativamente, como es el caso de la encina. En esta comunicación se describen los últimos avances en criobiotecnología de líneas embriogénicas y ejes cigóticos de encina aplicando técnicas de vitrificación mediante el uso de crioprotectores (líneas embriogénicas) o la desecación parcial ultrarrápida (ejes cigóticos). Estos métodos en combinación con el almacenado seco de polen constituyen la mejor estrategia para la conservación de germoplasma de encina y otros *Quercus* sp. de interés forestal como alcornoques y robles.

Palabras clave

Criobiotecnología, criopreservación, desecación parcial ultrarrápida, embriones somáticos, embriones cigóticos, polen, *Quercus ilex*, semillas, síndrome de la “seca”, vitrificación.

1. Introducción

La encina, *Quercus ilex* L., es una de las especies forestales más representativas del clima mediterráneo, aunque el 90% de su distribución mundial se concentra en la Península Ibérica y Marruecos. En España, la encina es la especie principal en los encinares y la predominante en las dehesas, las dos formaciones forestales más extensas del país (MAPAMA, 2015). En las últimas décadas las poblaciones de encina de la Península Ibérica se han reducido considerablemente generando un problema ambiental grave que amenaza la supervivencia y la sostenibilidad de estas formaciones. Entre los factores que han provocado esta reducción están: los cambios en la gestión de estos sistemas (VALLADARES *et al.*, 2014), el cambio climático, la escasa regeneración natural (PULIDO & PICARDO, 2010), y sobre todo el síndrome de la “seca” (CORCOBADO *et al.*, 2013). La “seca”, es una enfermedad de etiología compleja, resultado de la acción simultánea de diferentes agentes bióticos y abióticos, que provoca un declive progresivo de los árboles afectados, hasta su muerte. El problema que ha provocado la “seca” en España trasciende el interés productivo y ambiental, generando una preocupación social que se ha materializado en diferentes iniciativas públicas y privadas con el objetivo de investigar las causas que provocan la enfermedad además de desarrollar medidas de control que limiten su propagación. Entre estas iniciativas se incluye la puesta en marcha de un programa Nacional de mejora genética y de conservación de la encina y alcornoque coordinado por el Ministerio para la Transición Ecológica y Reto demográfico (MITECO) y la Empresa de Transformación Agraria (TRAGSA).

La conservación *ex situ* del germoplasma es una herramienta esencial para preservar una amplia diversidad genética de las especies vegetales (TANNER et al., 2021), quedando a disposición de las iniciativas que conservan las especies *in situ* y que puedan necesitar materiales vegetales de reproducción genéticamente diversos en casos de restauración ecológica o refuerzos poblacionales. Las semillas de encina son recalcitrantes, es decir, no soportan la desecación extrema (3-7% humedad) necesaria para su almacenamiento en bancos de semillas convencionales, perdiendo la viabilidad cuando su contenido de humedad es inferior al 20%. Su almacenamiento, estratificadas entre capas de un sustrato poroso o en bolsas de polietileno, a temperaturas entre -4 y +3 °C, permite únicamente su conservación durante el invierno posterior a su recolección hasta la siembra en primavera (VILLAR-SALVADOR et al., 2013). Por tanto, si se quiere abordar un programa de conservación *ex situ* a largo plazo de esta especie, este procedimiento resulta inapropiado.

En especies leñosas con semillas recalcitrantes o las que se propagan vegetativamente las técnicas biotecnológicas, como el cultivo *in vitro* y la criopreservación, han generado importantes contribuciones a la conservación *ex situ* de sus recursos genéticos (CORREDOIRA et al., 2017). La criopreservación (conservación en nitrógeno líquido (NL) a -196°C) es considerada la técnica más valiosa para la conservación *ex situ* de germoplasma vegetal (PENCE et al., 2020). Teóricamente, cualquier tejido u órgano vegetal (ápices de brotes cultivados *in vitro*, embriones somáticos (ES), yemas recolectadas en campo, polen, semillas o ejes embrionarios (EE)) puede ser criopreservado, siempre que se disponga de un sistema de regeneración *in vitro* que permita la obtención de una planta a partir del tejido u órgano almacenado en NL.

La criopreservación está especialmente recomendada para el almacenamiento a largo plazo de los embriones cigóticos (EC) de semillas recalcitrantes (WALTERS et al., 2013). Los EC se extraen directamente de las semillas tras remover la cubierta seminal y el endospermo, pero cuando los cotiledones son excesivamente grandes para favorecer una correcta y rápida criopreservación, se tiende a trabajar sólo con los ejes embrionarios (WALTERS et al., 2013), como ocurre con la encina. Los EE pueden ser germinados en condiciones *in vitro* con relativa facilidad (a menudo sin el uso de reguladores del crecimiento) y son el tejido preferente en la conservación de la biodiversidad de poblaciones silvestres, ya que cada embrión corresponde a una semilla y una amplia diversidad genética puede ser almacenada de manera análoga a lo que se hace en bancos de semillas convencionales (FAO 2014; BALLESTEROS et al., 2014).

La criopreservación de tejidos de cultivados *in vitro* puede ser una alternativa cuando la criopreservación de EC no es factible (PENCE, 2014). Los ápices aislados de brotes cultivados *in vitro* y los cultivos embriogénicos (especialmente embriones somáticos) son los tejidos comúnmente utilizados para criopreservación de especies de propagación vegetativa, incluidas las especies leñosas. Este tipo de tejidos tiene como ventaja que están disponibles durante todo el año y son fáciles de manipular, pueden producirse en grandes cantidades y, en consecuencia, proporcionan muchas réplicas clonales para los diferentes experimentos necesarios para optimizar los protocolos criogénicos (CORREDOIRA et al., 2017).

Un aspecto crítico para la aplicación de la criopreservación es reducir el contenido de agua en las células, para evitar la formación de cristales, que rompan las estructuras celulares durante los procesos de congelación y descongelación. Para ello, se han desarrollado diversas metodologías con el objetivo de minimizar el contenido de humedad de los tejidos y crioprotogerlos para su inmersión en NL (PENCE et al., 2020). Básicamente las técnicas aplicadas en leñosas frondosas son el enfriamiento lento y la vitrificación. En la criopreservación de material cigótico y somático se suele utilizar el método tradicional del enfriamiento lento o el método de la vitrificación. La vitrificación consiste en la transición directa del agua celular desde una fase líquida a una sólida, pero sin la formación de cristales de hielo. Esta fase sólida se conoce como vítreo o amorfa y generalmente se requiere el pretratamiento de los explantos con agentes crioprotectores (glicerol, manitol, sorbitol, dimetilsulfóxido, etilenglicol) y azúcares como glucosa y sacarosa (LI et al., 2018). Los crioprotectores por un lado favorecen la vitrificación mediante un incremento de la viscosidad intracelular, y por otro lado protegen los tejidos del daño potencial causado por la formación de cristales de hielo durante el almacenamiento en el NL. La vitrificación sin el uso de agentes

crioprotectores se realiza mediante un enfriado ultrarrápido tras una desecación parcial rápida. La vitrificación se ha utilizado exitosamente para la criopreservación de los EC y ES de diferentes especies con semillas recalcitrantes (ENGELMMAN 2011; SERSHEN et al., 2007; XIA et al., 2014; CORREDOIRA et al., 2017), incluidas Fagáceas de semilla recalcitrante como el castaño (CORREDOIRA et al., 2004) o media docena de especies de *Quercus* sp. (MARTÍNEZ et al., 2003; VALLADARES et al., 2004; BALLESTEROS & PRITCHARD, 2020). Sin embargo, hasta el momento la criopreservación de la encina ha sido escasamente estudiada, hecho que se refleja en la falta de publicaciones al respecto. El único protocolo definido hasta el momento para crioconservar ES no permite el almacenamiento a largo plazo (BARRA-JIMÉNEZ et al., 2015), y en la criopreservación de EE de encina no ha logrado la correcta germinación/regeneración de los ejes crioconservados (GONZÁLEZ-BENITO et al., 2002).

Tanto la criopreservación EC o EE como de los ES están sujetas a diferentes retos que derivan de: (1) las diferencias ecofisiológicas de las especies a conservar, (2) las variaciones de respuesta poblacionales o genotípicas dentro de una especie, (3) la respuesta diferencial de los múltiples tejidos que pueden existir dentro de estos explantos, y (4) la variación en respuesta a la regeneración *in vitro* de los tejidos criopreservados (BALLESTEROS et al., 2014; BALLESTEROS & PRITCHARD, 2020; CORREDOIRA et al., 2017). La solución a estos retos biotecnológicos se ha desarrollado tradicionalmente mediante experiencias de ensayo-error; sin embargo, está cada vez más aceptado que es necesaria una disciplina en la que mediante el uso de diferentes aproximaciones fundamentales (fisiología, ecología, criobiología, biofísica, genómica, proteómica, ...) se adquiera el conocimiento necesario de la respuesta de los explantos a los estreses derivados de la exposición a las bajas temperaturas y su posterior regeneración para conseguir un mejor desarrollo de las biotecnologías (cultivo *in vitro*, criopreservación) que den lugar a la conservación *ex situ* óptima de sus tejidos. A esta disciplina se le conoce con el nombre de criobiotecnología (PRITCHARD, 2018), y se ha señalado como necesaria para conseguir una óptima conservación *ex situ* de las especies de *Quercus* (BALLESTEROS & PRITCHARD, 2020).

2. Objetivos

Este trabajo, mediante la criobiotecnología, tiene como objetivo general facilitar soluciones para la falta de opciones de conservación *ex situ* a largo plazo de los recursos fitogenéticos de encina, tanto de genotipos específicos o élite (a través de ES), como de la amplia biodiversidad disponible en poblaciones silvestres (a través de EE). La finalidad última es poner estos recursos fitogenéticos a disposición de los gestores forestales para poder ser utilizados posteriormente en la restauración de encinares y dehesas.

Como objetivos específicos, este trabajo busca por un lado investigar los efectos beneficiosos del desecado y el enfriado ultrarrápido en la criopreservación de ejes embrionarios de encina, y definir un procedimiento efectivo de criopreservación mediante vitrificación de líneas embriogénicas de encina generadas a partir de árboles adultos.

3. Metodología

3.1. Criopreservación de embriones cigóticos

3.2.1. Material vegetal

Bellotas de encina de la región de procedencia 1 (Galaico-Leonesa) fueron recolectadas por el Centro Nacional de Recursos Genéticos Forestales ‘El Serranillo’, procesadas y almacenadas entre 0-3°C en bolsas de polietileno de 40-60 µm de galga cerradas herméticamente durante 3-6 semanas según estándares (VILLAR-SALVADOR et al., 2013). Posteriormente las bellotas fueron enviadas a Royal Botanic Gardens Kew por vía terrestre (2-3 días de transporte) en bolsas de polietileno para preservar su humedad, fueron almacenadas a su recepción a 5°C en oscuridad, y se utilizaron para los experimentos de criopreservación en no más de 12 semanas desde su recepción.

De cada bellota se extrajeron los EE en el laboratorio. Tras lavar las bellotas con abundante agua corriente, se quitó el pericarpo con un escalpelo y se lavaron las semillas durante 2 minutos en una solución de hipoclorito sódico al 0,5%, tras lo que se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y se secaron al aire sobre papel de filtro en la campana de flujo laminar. Se escindió cuidadosamente área del EC contenido los EE, dejando alrededor de 0,5 mm de tejido cotiledonar unido al hipocótilo. Los EE escindidos se colocaron sobre un papel humedecido con una solución de 50 mg/L de ácido ascórbico hasta su uso, que se produjo en menos de 2 horas desde que el primer EE fue escindido (BALLESTEROS et al., 2021).

3.2.2. Procedimiento de criopreservación mediante desecado parcial y enfriado ultrarrápido

Los EE escindidos, tras secarse con papel de filtro estéril, se introdujeron en la rejilla habilitada dentro de un “ultradescedador” construido en el laboratorio según las indicaciones de BALLESTEROS et al. (2021). Este “ultradescedador” consiste en un ventilador de ordenador de 12V dentro de un contenedor con sílicagel en el fondo, que lanza aire seco (alrededor del 10% humedad relativa) sobre los EE, que se disponen separados entre unas rejillas de nilón. Los ejes se desecaron por períodos de tiempo de entre 60 y 300 minutos. Treinta ejes por tiempo de desecado se desecaron simultáneamente tras lo que 10 se usaron para medir su contenido de agua, 10 se cultivaron tras su desecación, y 10 se enfriaron en NL.

Para el enfriamiento se testaron dos velocidades de enfriamiento, una más lenta ($3-8^{\circ}\text{C/s}$) y otra más rápida ($30-80^{\circ}\text{C/s}$) (BALLESTEROS et al., 2021). Para la velocidad más lenta los EE se introdujeron en criotubos (10 EE por criotubo) que se sumergieron en NL (-196°C), mientras que para la velocidad más rápida los EE se introdujeron en sobres de papel de aluminio de $3 \times 3\text{ cm}$ (5 embriones por sobre) y estos se sumergieron con pinzas enfriadas con NL en un granizado de NL a -210°C (formado por solidificación del NL en una cámara de vacío).

Para su descongelación, los EE se sumergieron directamente en una solución de 0,5 mM CaCl_2 y 0,5 mM MgCl_2 calentada en un baño de agua a $42 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 2 minutos. Seguidamente, se cambiaron a la misma solución pero a temperatura ambiente y se rehidrataron durante 30 minutos en oscuridad. Tras esto, los EE se introdujeron en la campana de flujo laminar para su esterilización (2 minutos de agitación en una solución de hipoclorito sódico al 1% más tres enjuagues con agua destilada estéril), se secaron al aire sobre papel de filtro, y se sembraron en tubos de $15 \times 2\text{ cm}$ o placas de 5 cm de diámetro con un medio de cultivo que consistió en medio Woody Plant Medium (WPM; LLOYD & McCOWN, 1980) suplementado con 2,5 g/L Phytigel (Sigma), 30 g/L sacarosa, vitaminas MS, y el pH ajustado a $5,6 \pm 0,1$.

El contenido de agua de cada EE se midió gravimétricamente en una balanza, tras desecarlos en un horno a 103°C durante 16 ± 2 horas y restar este peso seco al peso fresco antes de ser desecado en el horno. El contenido de agua se proporciona como g H_2O / g peso seco.

3.2.3. Evaluación de los datos y análisis estadístico

Para las medidas de viabilidad/desarrollo o de contenido de agua se utilizaron en total 30 EE por cada tiempo de desecado y velocidad de enfriado. De cada experimento se obtuvieron datos para 10 ejes por tiempo de desecado y velocidad de enfriado, y se realizaron tres experimentos en días diferentes. Los EE se cultivaron individualmente. En todos los experimentos realizados se incluyeron como controles 10 EE que no habían sido desecados ni enfriados.

Se evaluaron los siguientes parámetros: porcentaje de ejes que no mostraron crecimiento (NC), porcentaje de ejes que se hincharon y no ennegrecían (H), porcentaje de ejes que mostraban crecimiento no organizado (ej., callo; C), porcentaje de ejes que mostraron crecimiento de la raíz (elongación de al menos 1 mm; R), y porcentaje de ejes que mostraron recuperación del tallo (reverdecimiento del meristemo y/o elongación; T). Se consideró que un EE recuperó su capacidad de crecimiento correctamente cuando ambos ejes (raíz y tallo; RT) mostraron recuperación y que era viable (V) cuando mostraba cualquier capacidad de crecimiento (desde H y C hasta RT).

Las diferencias significativas entre tiempos de desecado y velocidad de enfriado para los diferentes parámetros de desarrollo medidos se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA). Ya que estos datos fueron registrados en porcentajes o proporciones (p) que siguen una

distribución binomial, se aplicó una transformación arcoseno para normalizar la distribución de los datos y las varianzas, y así poder analizarlos mediante ANOVA. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS Statistics v.19 (IBM, EEUU).

3.2. Criopreservación de embriones somáticos

3.2.1. Material vegetal

Para la definir un protocolo eficiente de criopreservación de ES se utilizaron 4 líneas embriogénicas denominadas E2, Q8, E00 and Q10-16. Las líneas E2, Q8 y E00 fueron iniciadas a partir de tegumentos de óvulos derivados de encinas adultas (BARRA-JIMÉNEZ *et al.*, 2014), mientras que la línea Q10-16 fue inducida a partir de una hoja aislada de brotes axilares cultivados *in vitro* y establecidos a partir de una encina centenaria (MARTÍNEZ *et al.*, 2017). Las líneas se mantienen mediante embriogénesis secundaria subcultivando masas proembriogénicas (PEMs), con subcultivos cada 6 semanas, en medio de proliferación que consistió en medio mineral SH (SCHENK & HILDEBRANDT, 1972), vitaminas MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), 30 g/L de sacarosa y 6 g/L de agar PPA (Condalab, España).

Los cultivos se mantuvieron en cámaras de crecimiento climatizadas con un fotoperíodo de 16h luz (tubos fluorescentes de luz blanca (Mazdafluor 7D TF 36 w/LJ) con una densidad de flujo fotónico de 50-60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) y con una temperatura de cultivo en cámara fue de 25°C con luz y de 20°C en oscuridad (condiciones estándar).

3.2.2. Procedimiento de criopreservación mediante vitrificación

Los explantos a crioconservar se precultivaron durante 3 días en medio de proliferación suplementado con sacarosa 0,3M. Posteriormente, los explantos se incubaron en 1,8 ml de solución de vitrificación PVS2 que consiste en glicerol 30% (p/v), etilenglicol 15% (p/v), dimetilsulfóxido 15% (p/v) y sacarosa 0,4 M (SAKAI *et al.*, 1990). Después de 15 min en PVS2 a 25°C, los explantos se introdujeron en NL durante un mes. Para su descongelación, los explantos se sumergieron en un baño de agua a 42°C durante 2 minutos. Seguidamente, se retiró la solución de PVS2 y los explantos fueron entonces lavados dos veces durante 10 minutos con 1,8 ml de solución de lavado, que está compuesta por medio mineral SH suplementado con sacarosa 1,2 M. A continuación, los explantos se transfirieron a medio de proliferación donde se cultivaron en condiciones estándar durante 6 semanas.

En el primer experimento se evaluó efecto del estado de desarrollo de los ES utilizados como explanto a criopreservar. Para ello se compararon tres tipos de explantos de las líneas Q8 y E2: 1-3 PEMs individualizadas, grupos de 2-3 embriones en estado globular-torpedo y ES individualizados en estado cotiledonar temprano.

3.2.3. Efecto del genotipo

Para evaluar el efecto del genotipo en la criopreservación, se criopreservaron PEMs individualizadas de las líneas Q8, E2, E00 y Q10-16 aplicando el protocolo descrito en el apartado 3.2.2.

3.2.4. Evaluación de los datos y análisis estadístico

En cada línea y por cada tipo de explanto se utilizaron 3 placas Petri con diez explantos por placa. En todos los experimentos realizados se incluyeron como controles muestras de material tratado solamente con sacarosa 0,3M y controles sin almacenamiento en NL ni tratamiento con sacarosa 0,3M.

La toma de datos se realizó evaluando los parámetros, porcentaje de supervivencia y porcentaje de recuperación embriogénica definido como el número de explantos que muestran formación de nuevos ES en estado cotiledonar.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS Statistics 26 aplicando un ANOVA de tipo II y previamente los porcentajes fueron normalizados mediante una transformación con la función arcoseno \sqrt{x} .

4. Resultados

4.1. Criopreservación embriones cigóticos

Los EE de encina utilizados tras su escisión tenían un contenido de agua previo a la desecación de $1,58 \pm 0,17$ g H₂O / g peso seco (que equivale a un contenido de agua del 59,7±1,8% en base al peso fresco [bpf]). Este contenido de agua medio variaba ligeramente entre ejes, con el eje caulinar ligeramente más húmedo ($1,67 \pm 0,23$ g H₂O / g peso seco en promedio o 62,3±3,3% bpf) que el eje radical ($1,49 \pm 0,11$ g H₂O / g peso seco o 59,7±1,8% bpf). La desecación ultrarrápida hizo disminuir el contenido de agua de los EE muy rápido (más de la mitad del contenido de agua inicial) en la primera hora de desecado, reduciéndose luego progresivamente (Figura 1A). Esta desecación hizo perder hasta perder casi un orden de magnitud en solo 300 minutos de desecado, de manera que el contenido de agua del explanto completo (incluyendo los dos EE) bajó hasta $0,17 \pm 0,04$ g H₂O / g peso seco (14,7±2,6% bpf), y promedió $0,23 \pm 0,08$ g H₂O / g peso seco y $0,19 \pm 0,05$ g H₂O / g peso seco (18,4±5,0% bpf y 15,7±3,4% bpf) para el eje caulinar y radical, respectivamente (Figura 1A).

Durante el desecado la viabilidad y capacidad de crecimiento de los EE se mantuvo intacta las primeras tres horas de desecado (Figura 1B), tiempo en el que el contenido de agua de los ejes disminuyó hasta los $0,27 \pm 0,06$ g H₂O / g peso seco ($21,2 \pm 3,6\%$ bpf) y promedió $0,36 \pm 0,16$ g H₂O / g peso seco y $0,27 \pm 0,10$ g H₂O / g peso seco ($25,9 \pm 57,1\%$ bpf y $20,9 \pm 5,3\%$ bpf) para el eje caulinar y radical, respectivamente (Figura 1C). A partir de ahí tanto la viabilidad como la capacidad de crecimiento de ambos EE disminuyó significativa y rápidamente, bajando por ejemplo la capacidad de formar raíz y tallo (RT) desde un $73 \pm 15\%$ (180 min desecado, Figura 1B) hasta un $11 \pm 10\%$ (300 min desecado, Figura 1B),

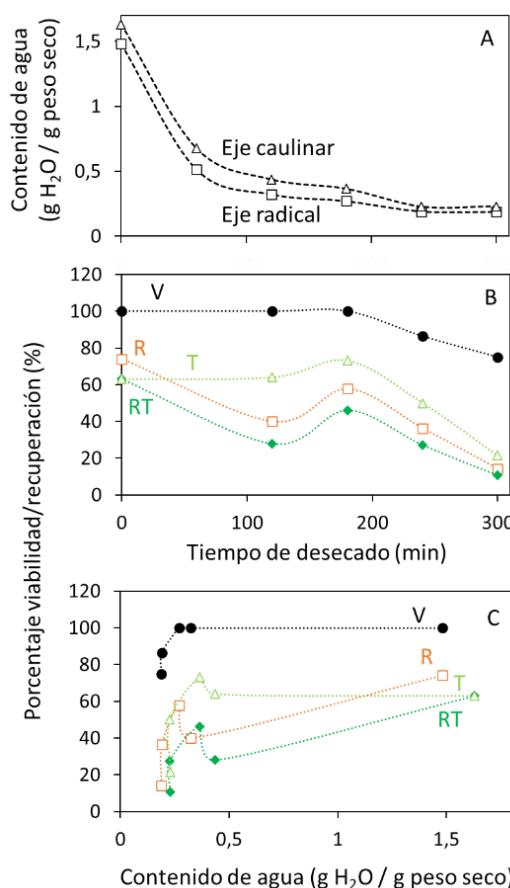


Figura 1. Cambios en el contenido de agua y la viabilidad o capacidad de crecimiento de los diferentes EE durante su desecado.

La exposición a NL de los EE tuvo como consecuencia una pérdida de viabilidad y crecimiento significativa ($P<0.05$), particularmente en los tiempos de desecado menores. Por ejemplo, tras 60 min de desecado la viabilidad cayó de un 100% (desecado sin exposición a NL, Figura 1B) a un 70% (desecado y exposición a NL a $3-8\text{ }^{\circ}\text{C/min}$; Figura 2A) y el crecimiento organizado (RT) de un 63% a un 0% (comparar Figura 1B y 2A). Progresivamente, a medida que el tiempo de desecado se incrementaba, la viabilidad y el crecimiento sufrieron un menor descenso al comparar EE desecados antes y después de su exposición al NL. Así pues, los ejes desecados durante 300 minutos mostraron una viabilidad del 75% antes del NL y del 69% después (comparar Figura 1B y 2A) y un desarrollo caulinar (T) del 21% antes del NL y del 19% después (comparar Figura 1B y 2A), pero sin ningún EE desarrollando ambos ejes (RT). Los mejores valores de viabilidad y crecimiento tras la exposición al NL ($3-8\text{ }^{\circ}\text{C/min}$) se obtuvieron a los 240 min de desecado, con una viabilidad del 100% de los ejes, un correcto desarrollo caulinar (T+RT) para el 45% de los ejes, y un desarrollo completo (RT) para el 21% de los ejes (Figura 2A).

La velocidad de enfriado más elevada no pareció incrementar el desarrollo de los EE expuestos a NL, simplemente parece que incrementó el desarrollo en aquellos desecados por menos tiempo mientras que perjudicaba a aquellos desecados por más tiempo (comparar 240 min en Figura 2A y B), obteniéndose los mejores resultados a los 180 min de desecado, con una viabilidad del 100% de los ejes, un correcto desarrollo caulinar (T+RT) para el 46% de los ejes, y un desarrollo completo (RT) para el 25% de los ejes (Figura 2A).

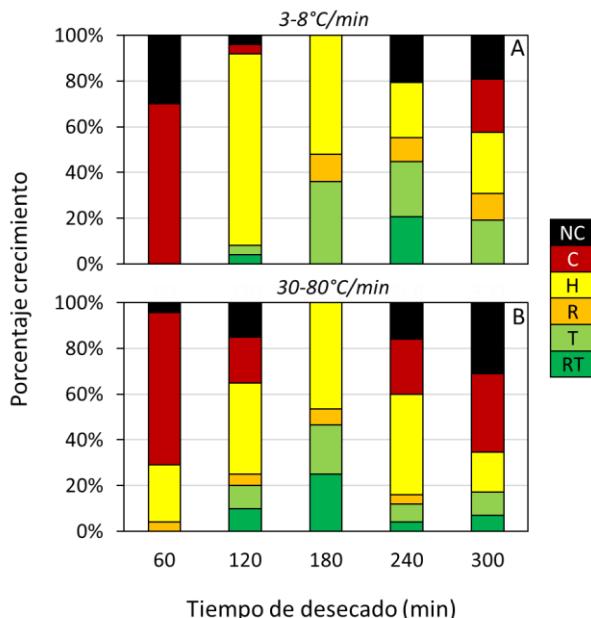


Figura 2. Capacidad de crecimiento de los diferentes EE tras su exposición a NL con un enfriado más lento (A: $3-8\text{ }^{\circ}\text{C/min}$) o más rápido (B: $30-80\text{ }^{\circ}\text{C/min}$).

4.2. Criopreservación de ES

En el primer experimento se trató de determinar el estado óptimo de desarrollo que deberían de mostrar los ES que se van a almacenar en NL. Para ello se utilizaron dos líneas embriogénicas, E2 y Q8, y tres tipos de explantes, PEMs, y embriones en estado globular y cotiledonar temprano, a los que se les aplicó un periodo de precultivo de 3 días en sacarosa 0,3 M, para posteriormente tratarlos con la solución PVS2 durante 15 minutos, seguido del almacenamiento en NL durante un mes (Tabla 1).

En ambas líneas, el porcentaje de supervivencia estuvo afectado por el tipo de explanto, por la exposición al NL y por la interacción de ambos factores ($p\leq 0,001$; Tabla 1). Al haber una interacción

positiva entre factores, se procedió al análisis por separado de cada factor. El porcentaje de supervivencia en el material tratado con PVS2 pero no criopreservado no fue significativamente diferente, siendo del 100% en todos los explantes utilizados. Por el contrario, la exposición al NL afectó negativamente a la supervivencia, de tal manera que en la línea E2 sólo se observaron explantes vivos cuando el explante criopreservado fueron PEMs, mientras que en la línea Q8 se observaron explantes vivos cuando se utilizaron PEMs y embriones globulares, aunque las PEMs presentaron una mayor y significativa supervivencia (88,3%). De igual modo, en ambas líneas el porcentaje de recuperación embriogénica estuvo también afectado por el tipo de explante ($p \leq 0,001$), por la exposición al NL ($p \leq 0,001$) y por la interacción de ambos factores ($p \leq 0,01$; Tabla 1). Al analizar por separado cada factor, se vio que en las dos líneas los mejores resultados se obtuvieron cuando se criopreservaron PEMs.

Tabla 1. Porcentajes de supervivencia y recuperación embriogénica de cultivos embriogénicos de las líneas Q8 y E2, después de un precultivo de 3 días en medio con sacarosa 0,3M, tratamiento con la solución vitrificadora PVS2 durante 15 min e inmersión en NL durante un mes, descongelado y posterior cultivo durante 6 semanas en medio de proliferación.

TIPO DE EXPLANTO	SUPERVIVENCIA (%)			RECUPERACIÓN EMBRIOGÉNICA (%)		
LÍNEA Q8	-NL	+NL	Media	-NL	+NL	Media
PEMs	100 ± 0,0a	88,3 ± 2,8a	94,1a	96,7 ± 2,8a	56,7 ± 2,8b	76,7a
Globular	100 ± 0,0a	3,3 ± 2,8b	51,7b	66,7 ± 2,8b	3,3 ± 2,8c	35,0b
Cotiledonar	100 ± 0,0a	0,0 ± 0,0b	50,0b	3,3 ± 2,8c	0,0 ± 0,0c	1,65c
Media	100a	30,5b		55,6a	30,0b	
ANOVA II						
Exposición NL (A)	$P \leq 0,001$			$P \leq 0,001$		
Explanto (B)	$P \leq 0,001$			$P \leq 0,001$		
A x B	$P \leq 0,001$			$P \leq 0,01$		
LÍNEA E2						
PEMs	100 ± 0,0a	80,0 ± 0,0b	90,0a	93,3 ± 2,8a	46,7 ± 2,8c	70,0a
Globular	100 ± 0,0a	0,0 ± 0,0c	50,0b	66,7 ± 2,8b	0,0 ± 0,0d	33,4b
Cotiledonar	100 ± 0,0a	0,0 ± 0,0c	50,0b	3,3 ± 2,8d	0,0 ± 0,0d	1,65c
Media	100a	26,7b		54,4a	15,6b	
ANOVA II						
Exposición NL (A)	$P \leq 0,001$			$P \leq 0,001$		
Explanto (B)	$P \leq 0,001$			$P \leq 0,001$		
A x B	$P \leq 0,001$			$P \leq 0,01$		

Cada valor representa la media ± el error estándar de 3 replicados con 10 explantes cada uno. PEMs: masas proembriogénicas; NL: nitrógeno líquido; ns: no significativo. Los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente para $p=0,05$.

En la línea Q8, se observó la formación de nuevos embriones cuando se criopreservaron PEMs y embriones globulares, aunque las PEMs presentaron una mayor y significativa recuperación (56,7%). En la línea E2 únicamente se observó recuperación embriogénica cuando el explante a criopreservar fueron PEMs (46,7%). El tratamiento con PVS2 parece afectar negativamente a los ES en estado globular y cotiledonar ya que en los explantes en esos estados tratados con PVS2 y no criopreservados se redujo el desarrollo de nuevos embriones (Tabla 1).

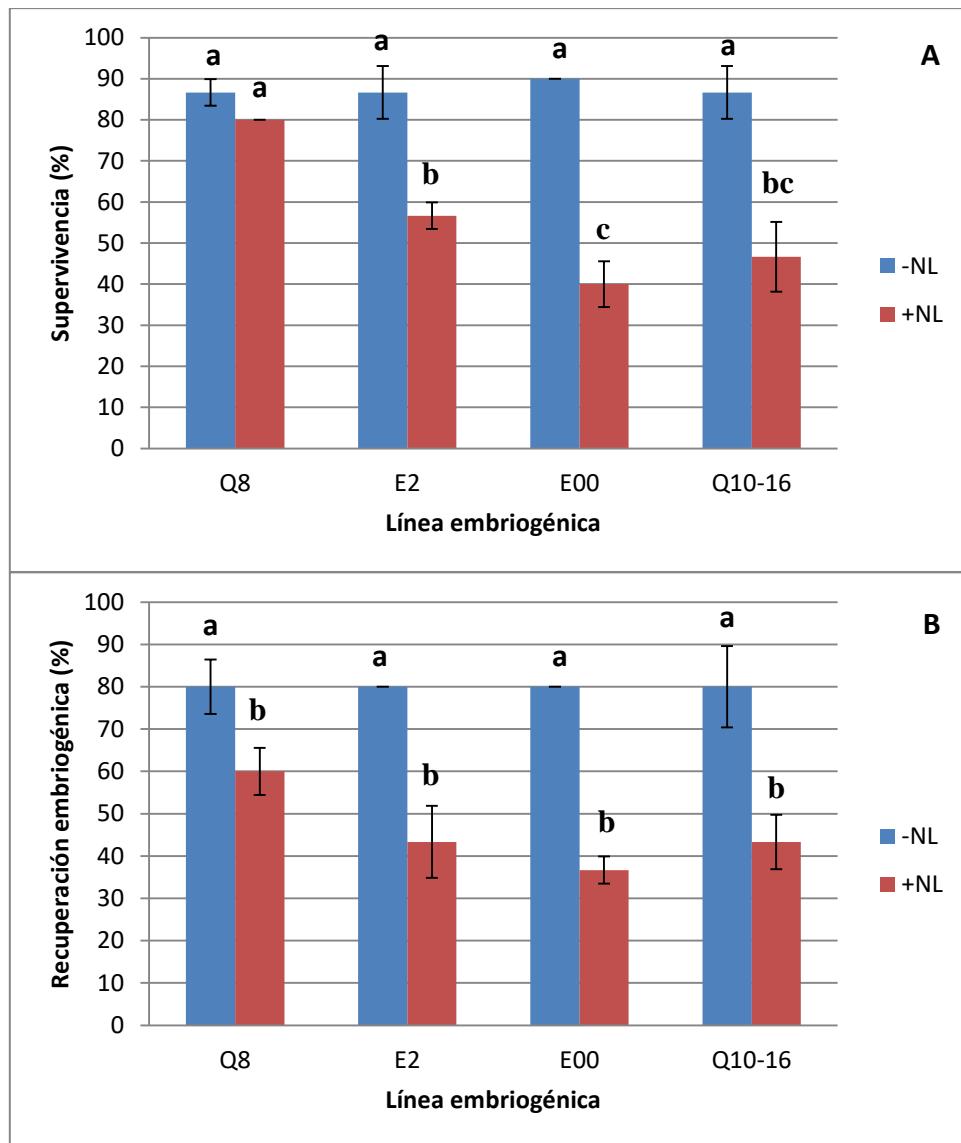
En las dos líneas y en todos los tipos de explantos, en los controles almacenados en NL, que no habían recibido precultivo en sacarosa 0,3M ni habían sido tratados con la solución PVS2 el porcentaje de supervivencia fue cero.

Una vez determinado el explanto más adecuado para la criopreservación, en un segundo experimento se evalúo el efecto del genotipo de las líneas embrionarias en su respuesta a la criopreservación (Figura 4). Para ello PEMs de cuatro líneas embrionarias de encina se almacenaron en NL durante un mes después de un pretratamiento de 3 días en sacarosa 0,3 M y 15 minutos en PVS2. El ANOVA aplicado determinó que el porcentaje de supervivencia no se vio significativamente afectado por el genotipo pero si por la exposición a NL ($p \leq 0,001$) y por la interacción de ambos factores ($p \leq 0,05$). Atendiendo a esta interacción significativa se procedió a analizar el efecto de la exposición a NL en cada uno de los distintos genotipos estudiados. La exposición a NL redujo significativamente los porcentajes de supervivencia en todas las líneas excepto en la línea Q8, que mantuvo una supervivencia del 80% ($P \leq 0,05$ para E2, E00 y Q10-16; Figura 4A). El porcentaje de supervivencia en el material tratado con PVS2 pero no expuesto a NL fue elevado en todas las líneas, observándose valores del 86-90% en todos los genotipos ($p > 0,05$; Figura 4A).

De manera similar a la supervivencia, el porcentaje de recuperación embrionaria también estuvo afectado significativamente por el almacenamiento en NL ($p \leq 0,001$), pero no por el genotipo, no habiendo en este caso una interacción significativa entre ambos factores. El porcentaje de recuperación embrionaria en el material tratado con PVS2 y no criopreservado fue del 80% en todas las líneas evaluadas (Figura 4B). Por el contrario, la inmersión en NL de los explantos redujo significativamente ($p \leq 0,001$) el porcentaje de recuperación embrionaria en las cuatro líneas, obteniéndose porcentajes del 37-60% (Figura 4B).

5. Discusión

Para asegurar la adaptabilidad de las poblaciones de encina en los encinares y dehesas españoles gravemente amenazados (FERNÁNDEZ I MARTÍ *et al.*, 2018) es necesario conservar una buena parte de la variación genética adaptativa que existe en sus poblaciones (DE VRIES *et al.*, 2015). La diversidad genética o potencial evolutivo es fundamental para que los árboles puedan subsistir, adaptarse y evolucionar bajo situaciones ambientales variables (BACKS *et al.*, 2021). Los recursos genéticos forestales se conservan preferible y mayoritariamente *in situ*, con una orientación dinámica que favorece la adaptabilidad natural de las poblaciones existentes. Sin embargo, en el contexto actual de cambio rápido de condiciones abioticas y abioticas asociadas al cambio climático, este tipo de conservación puede dar lugar a una pérdida irreversible de ciertos genotipos que podrían ser vitales para la subsistencia de la especie en el futuro. Por tanto, para alcanzar una conservación eficiente es necesario la complementariedad de la conservación *in situ* con medidas de conservación *ex situ* (colecciones vivas o en bancos de germoplasma). Estas colecciones *ex situ* (particularmente los bancos de germoplasma) actúan como copia de seguridad a largo plazo de la amplia variación genética de la especie, quedando a disposición de los gestores de la biodiversidad en futuras actuaciones de restauración ecológica o refuerzo poblacional. Las herramientas biotecnológicas disponibles en la actualidad suponen una ayuda muy importante en la conservación de recursos fitogenéticos, especialmente en especies leñosas (CORREDOIRA *et al.*, 2017). Dentro de estas, la criopreservación puede considerarse el método más seguro y eficaz para el almacenamiento a largo plazo de un gran número de especies. Sin embargo, la criopreservación del germoplasma de especies leñosas no es sencilla, y está sujeta a diferentes retos en función de las especies y tejidos a conservar. La criobiología es la disciplina que alienta el estudio fundamental de la respuesta a las bajas temperaturas del germoplasma a conservar para tratar de desarrollar protocolos de criopreservación óptimos. En este trabajo hemos estudiado qué influye en la supervivencia EE y ES de encina tras la exposición al NL.



Los EE de semillas recalcitrantes (como la encina), en su madurez (dispersión de la semilla), contienen elevados contenidos de agua, generalmente por encima del 50% bpf ($>1.0 \text{ gH}_2\text{O/g peso seco}$), y se caracterizan porque no toleran su desecación por debajo de contenidos de agua del 20% bpf ($<0.20 \text{ gH}_2\text{O/g peso seco}$) (BERJAK & PAMMENTER, 2008). Este contenido de agua suele representar el límite en el que el agua presente en las células y tejidos lo hace de forma “estructural” (es decir, asociada a macromoléculas, $< 0.20 \text{ gH}_2\text{O/g peso seco}$) o “libre” (es decir, en disolución, $>0.20 \text{ gH}_2\text{O/g peso seco}$) (BERJAK & PAMMENTER, 2008). Aunque los EE de semillas recalcitrantes pueden tolerar cierta deshidratación siempre que haya agua “libre”, sus células y tejidos no están adaptados a la eliminación del agua “estructural”, y cuando esta agua es removida son expuestos a graves daños físicos y metabólicos (BERJAK & PAMMENTER, 2000). Sin embargo, cuando hay agua “libre”, esta tiende a formar cristales de hielo cuando es expuesta a temperaturas bajo cero. Dicho esto, para la correcta criopreservación de los EE de semillas recalcitrantes, es imprescindible llegar a un equilibrio en su contenido de agua, que ha de ser no demasiado bajo para inferir daños por desecación, pero no suficientemente alto para favorecer la formación y crecimiento

de cristales de hielo. Alcanzado este equilibrio, la matriz acuosa de las células solidifica pasando a un estado vítreo donde la presencia de cristales de hielo es mínima o si existen son un tamaño tan pequeño que no ejercen daño mecánico en los orgánulos (BERJAK & PAMMENTER, 2008; WESLEY-SMITH et al., 2014, 2015).

Dos estrategias ayudan a favorecer este proceso de vitrificación en EE de semillas recalcitrantes: el desecado rápido de los explants y un enfriado rápido hasta las temperaturas dadas por el NL (<-130 °C) (BERJAK & PAMMENTER, 2008). Por un lado, el desecado rápido de los EE incrementa su tolerancia al desecado, de manera que EE que con un desecado lento sólo toleran contenidos de agua del 40-50% bpf (0.8-1.0 gH₂O/g peso seco), con un desecado rápido toleran contenidos de agua cercanos al 20% bpf (0.20 gH₂O/g peso seco) (BERJAK & PAMMENTER, 2008). Por otro lado, el enfriado rápido incrementa no sólo la supervivencia tras la exposición a NL, sino también la ventana de contenidos de agua a la que los EE pueden ser expuestos de manera segura a las temperaturas del NL (WESLEY-SMITH et al., 2001). En este trabajo hemos usado el desecado ultrarrápido ejercido un ventilador funcionando a una humedad relativa <15% (BALLESTEROS et al., 2021) que ha dado buenos resultados en los EE y EC de otras semillas recalcitrantes de ambientes temperados y tropicales (BERJAK & PAMMENTER, 2008; SERSHEN et al., 2007; XIA et al., 2014). Con este desecado ultrarrápido hemos conseguido una supervivencia del 100% de los ejes tras su exposición a NL, una recuperación del eje caulinar de hasta el 45% de los explants criopreservados, y además un crecimiento correcto de ambos ejes en un 20-25% de los explants utilizados. Este resultado supone un claro avance respecto a intentos anteriores de criopreservar EE de encina (GONZÁLEZ-BENITO et al., 2002). Sin embargo, el uso de velocidades de enfriado elevadas en este trabajo no aportó un éxito mayor en los porcentajes de recuperación de los ejes tras la criopreservación, pero si un buen éxito en EE que se exponían al NL con contenidos de agua mayores. Este resultado apoya otras observaciones en las que la vitrificación y la reducción de cristales de hielo necesaria para una correcta criopreservación se puede conseguir en explants de mayores contenidos de agua si la velocidad de enfriado se incrementa (WESLEY-SMITH et al., 2001) y podría ser de ayuda en el desarrollo de futuros protocolos.

Aunque en los últimos años se ha producido un avance considerable en la criopreservación de ES en muchas especies leñosas, incluidas varias especies de la familia de las Fágaceas (VIEITEZ et al., 2012; CORREDOIRA et al., 2014; CORREDOIRA et al., 2017; BALLESTEROS & PRITCHARD, 2020), en la encina la criopreservación de cultivos embrionarios apenas ha sido investigada. Únicamente podemos mencionar el trabajo de BARRA-JIMÉNEZ et al. (2015) en el que aplicando un método basado en la vitrificación se describió la criopreservación de dos de las cuatro líneas empleadas en el presente trabajo, pero solo se observó la recuperación embrionaria en explants almacenados durante 24H en NL, mientras que los almacenados durante un mes únicamente se logró la formación de callo. En el presente trabajo, se ha definido por primera vez un protocolo eficiente para la criopreservación de líneas embrionarias de encina a largo plazo mediante la reducción del tiempo de exposición a la solución PVS2 de 30 a 15 minutos, y utilizando PEMs aisladas en lugar de embriones globulares. El proceso de vitrificación es un método relativamente simple ya que solo requiere la utilización de una solución crioprotectora y una rápida inmersión en NL, sin embargo, para lograr el éxito del protocolo es muy importante definir el tipo de explanto a criopreservar, así como el tiempo de exposición a la solución de vitrificación, en este caso la solución PVS2 (CORREDOIRA et al., 2017; PENCE et al., 2020). Es clave para encontrar un equilibrio entre la deshidratación adecuada y minimizar los efectos de toxicidad química de las soluciones de vitrificación (KAVANI, 2011). En las diferentes especies de las Fágaceas donde se ha logrado la criopreservación el tiempo de exposición a solución de vitrificación oscila entre 30-60 min (MARTÍNEZ et al., 2003; CORREDOIRA et al., 2004; 2014; VALLADARES et al., 2004), sin embargo, los cultivos embrionarios de encina parecen mostrar una gran sensibilidad a la solución PVS2 por lo que ha sido clave reducir la exposición a 15 minutos para lograr la criopreservación. El estado de desarrollo en el que se criopreservan los ES influyó significativamente en las tasas de recuperación posteriores a la exposición al LN. Las PEMs resistieron mejor el almacenamiento en LN que los embriones en etapa cotiledonar más diferenciados, en los que las células exhiben niveles más altos

de vacuolización y diferenciación que las células en división activa presentes en las capas más superficiales de las PEMs (CORREDOIRA et al., 2014).

6. Conclusiones

La criopreservación integrada de diferentes tejidos ofrece la posibilidad de crear bancos de germoplasma de una variedad de tejidos para una especie, independientemente del mayor o menor éxito de los protocolos existentes, pero siempre que éstos lleguen a unos porcentajes de recuperación mínimos (generalmente >20%, BALLESTEROS & PRITCHARD, 2020). Estos ayudarían no solo en el almacenamiento de materiales seleccionados por sus características superiores, sino también para la conservación de especies vegetales amenazadas o con semilla recalcitrante que no pueden ser almacenadas por largos períodos de tiempo (PENCE et al., 2020), como en encina (MARTÍNEZ et al., 2019; BALLESTEROS & PRITCHARD, 2020). En esta especie, sugerimos la criopreservación integrada de ES y EE con los métodos de vitrificación ya existentes (los descritos en este trabajo) para proporcionar una copia de seguridad a determinados genotipos maternos en un mínimo de espacio y con bajo mantenimiento. Estos, podrían ser usados como materiales vegetales de propagación en trabajos de restauración ecológica de encinares y dehesas tras su multiplicación in vitro o facilitar enormemente el acceso a materiales necesarios en programas de mejora dentro de esta especie. Complementariamente, el almacenado de polen proporcionaría un amplio abanico de genotipos paternos que actuaría como almacén de la biodiversidad de la especie, a usar para enriquecer la diversidad genética de la encina mediante programas de hibridación controlada (BALLESTEROS & PRITCHARD, 2020).

7. Agradecimientos

Este trabajo ha sido desarrollado gracias a proyectos financiados por: Fundación Garfield Weston (Global Tree Seed Project), MICINN (PID2020-112627RB-C33), MITECO y TRAGSA (TSA0068372). Royal Botanic Gardens, Kew, recibe financiación del Departamento para asuntos rurales, ambientales, y alimentos (Defra) de Reino Unido. Los autores agradecen al Centro Nacional de Recursos Genéticos Forestales 'El Serranillo' por donar bellotas para algunos de los experimentos realizados y al Dr. Mariano Toribio (IMIDRA) la cesión de las líneas Q8, E2 y E00.

8. Bibliografía

- BACKS, J. R.; HOBAN, S.; ASHLEY, M. V. 2021. Genetic diversity assessment of ex situ collections of endangered *Quercus hinckleyi*. *Int. J. Plant Sci.* 182, 3, 220-228.
- BALLESTEROS, D.; FANEGA-SLEZIAK N.; DAVIES R. M. 2021. Cryopreservation of Seeds and Seed Embryos in Orthodox-, Intermediate-, and Recalcitrant-Seeded Species. En: Wolkers, W.F.; Oldenhof, H. (eds.): Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology, vol 2180. Páginas 663-682. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1_36
- BALLESTEROS, D.; PRITCHARD, H. W. 2020. The Cryobiotechnology of Oaks: An Integration of Approaches for the Long-Term Ex Situ Conservation of *Quercus* Species. *Forests* 11(12), 1281.
- BALLESTEROS, D.; VARGHESE, B.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. 2014. Uneven drying of zygotic embryos and embryonic axes of recalcitrant seeds: challenges and considerations for cryopreservation. *Cryobiology* 69(1), 100-109.

BARRA-JIMÉNEZ, A.; ARONEN, T.S.; ALEGRE, J.; TORIBIO, M. 2015. Cryopreservation of embryogenic tissues from mature holm oak trees. *Cryobiology* 70, 217-225.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. 2000. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. *Revista Brasileira de Fisiología Vegetal* 12, 22-55.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. 2008. From Avicennia to Zizania: seed recalcitrance in perspective. *Ann. Bot.* 101(2), 213-228.

CORCOBADO, T; SOLLA, A.; MADEIRA, M. A.; MORENO, G. 2013. Combined effects of soil properties and *Phytophthora cinnamomi* infections on *Quercus ilex* decline. *Plant Soil* 373(1-2), 403-413. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1804-z>

CORREDOIRA, E.; MARTÍNEZ, M. T.; SANJOSÉ, M. C.; BALLESTER, A. 2017. Conservation of Hardwood Forest Species. En: Ahuja M.; Jain S. (eds.): Biodiversity and Conservation of Woody Plants. Sustainable Development and Biodiversity, vol 17. Páginas 421-453. Springer, Cham. Suiza. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66426-2_14

CORREDOIRA, E.; SAN-JOSÉ, M. C.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A. M. 2004. Cryopreservation of zygotic embryo axes and somatic embryos of European chestnut. *Cryo-Letters* 25(1), 33-42.

CORREDOIRA, E.; TORIBIO, M.; VIEITEZ, A. 2014. Clonal propagation via somatic embryogenesis in *Quercus* spp. En: Ramawat, K.; Mérillon, J.-M.; Ahuja, M. (eds.): Tree Biotechnology. Páginas 264-302. CRC Press. USA. <https://doi.org/10.1201/b16714-13>

DE VRIES, S.M.; ALAN, M.; BOZZANO, M.; BURIANEK, V.; COLLIN, E.; COTTRELL, J.; ... & YRJÄNÄ, L. 2015. Pan-European strategy for genetic conservation of forest trees and establishment of a core network of dynamic conservation units. European Forest Genetic Resources Programme (EUFORGEN), Bioversity International, Rome, Italy. xii, 3.

ENGELMANN, F. 2011. Cryopreservation of Embryos: An Overview. En: Thorpe, T.; Yeung, E. (eds.): Plant Embryo Culture. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 710. Páginas 155-184. Humana Press. UK. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-988-8_13

FAO. 2014. Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rev. ed. Rome. Italy.

FERNÁNDEZ I MARTI, A.; ROMERO-RODRÍGUEZ, C.; NAVARRO-CERRILLO, R.M.; ABRIL, N.; JORRÍN-NOVO, J.V.; DODD, R.S. 2018. Population Genetic Diversity of *Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp. Reveals Divergence in Recent and Evolutionary Migration Rates in the Spanish Dehesas. *Forests* 9, 337. <https://doi.org/10.3390/f9060337>

GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; PRIETO, R. M.; HERRADÓN, E.; MARTÍN, C. 2002. Cryopreservation of *Quercus suber* and *Quercus ilex* embryonic axes: In vitro culture, desiccation and cooling factors. *Cryo-Letters* 23, 283-290.

KAVANI, B. 2011. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *Aust. J. Crop Sci.* 5, 778-800.

LI, J. W.; OZUDOGRU, E. A.; LI, J.; WANG, M.-R.; LAMBARDI, M.; WANG, Q.-CH. 2018. Cryobiotechnology of forest trees: recent advances and future prospects. *Biodivers. Conserv.* 27, 795–814. <https://doi.org/10.1007/s10531-017-1481-y>

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.

MAPAMA. 2015. Los encinares. 50 años del Inventario Forestal Nacional. [Jornada Técnica sobre el Inventario Forestal Nacional. Cincuenta años conociendo el Bosque](#). Formaciones arboladas de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Gobierno de España. https://www.mapa.gob.es/images/es/qilex_tcm30-153760.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.

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, 321-333.

MARTÍNEZ, M. T.; SAN-JOSÉ, M. D. 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.

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

PENCE, V. C. 2014. Tissue cryopreservation for plant conservation: Potential and challenges. *Int. J. Plant Sci.* 75, 40 – 45.

PENCE, V. C.; BALLESTEROS, D.; WALTERS, C.; REED, B. M.; PHILPOTT, M.; DIXON, K. W.; PRITCHARD, H.W.; CULLEY, T.M.; VANHOVE, A.C. 2020. Cryobiotechnologies: Tools for expanding long-term ex situ conservation to all plant species. *Biol. Conserv.* 250, 108736.

PRITCHARD, H. W. 2018. The rise of plant cryobiotechnology and demise of plant cryopreservation? *Cryobiology* 85, 160-161.

PULIDO, F. J.; PICARDO, A. 2010. Libro verde de la dehesa. Documento para el debate hacia un Estrategia Ibérica de gestión. Junta de Castilla y León, Sociedad Española de Ciencias Forestales, Sociedad Española para el Estudio de los Pastos, Asociación Española de Ecología Terrestre y Sociedad Española de Ornitología.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. brasiliensis Tnaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.* 9, 30-33.

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.

SERSHEN, N.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.; WESLEY-SMITH, J. 2007. Cryopreservation of embryonic axes of selected amaryllid species. *Cryo-Letters* 28(5), 387-399.

TANNER, J. D.; CHEN, K. Y.; BONNART, R. M.; MINAS, I. S.; VOLK, G. M. 2021. Considerations for large-scale implementation of dormant budwood cryopreservation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 144(1), 35-48. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01884-5>

VALLADARES, F.; BENAVIDES, R.; RABASA, S. G.; DÍAZ, M.; PAUSAS, J. G.; PAULA, S.; SIMONSON, W. D. 2014. Global change and Mediterranean forests: Current impacts and potential responses. En: Coomes, D. A.; Burslem, D. F. R. P.; Simonson, W. D (eds.): *Forests and Global Change*. Páginas 47-76. Cambridge University Press. UK. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107323506.005>

VALLADARES, S.; TORIBIO, M., CELESTINO, C.; VIEITEZ, A.M. 2004. Cryopreservation of embryogenic cultures from mature *Quercus suber* trees using vitrification. *Cryo-Letters* 25, 177-186.

VIEITEZ, A. M.; CORREDOIRA, E.; MARTÍNEZ, M. T.; SAN-JOSÉ, M. C.; SÁNCHEZ, C., VALLADARES, S., BALLESTER, A. 2012. Application of biotechnological tools to *Quercus* improvement. *Eur. J. For. Res.* 131(3), 519-539.

VILLAR-SALVADOR, P.; NICOLAS, J. L.; HEREDIA, N.; USCOLA, M. 2013. *Quercus ilex* L. En: PEMÁN, J.; NAVARRO-CERRILLO, R. M.; NICOLÁS, J. L.; PRADA, M. A.; SERRADA, R. (eds.): *Producción y Manejo de Semillas y Plantas Forestales*. Tomo II. Páginas 226–250. Organismo Autónomo Parques Nacionales. Madrid.

WALTERS, C.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.; KENNEDY, K.; RAVEN, P. 2013. Preservation of recalcitrant seeds. *Science* 339(6122), 915-916.

WESLEY-SMITH, J.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W.; WALTERS, C. 2014. Intracellular ice and cell survival in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*: an ultrastructural study of factors affecting cell and ice structures. *Ann. Bot.* 113(4), 695-709.

WESLEY-SMITH, J.; WALTERS, C.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. 2001. Interactions among water content, rapid (nonequilibrium) cooling to -196° C, and survival of embryonic axes of *Aesculus hippocastanum* L. seeds. *Cryobiology* 42(3), 196-206.

WESLEY-SMITH, J.; WALTERS, C.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. 2015. Why is intracellular ice lethal? A microscopical study showing evidence of programmed cell death in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*. *Ann. Bot.* 115(6), 991-1000.

XIA, K.; HILL, L. M.; LI, D.-Z.; WALTERS, C. 2014. Factors affecting stress tolerance in recalcitrant embryonic axes from seeds of four *Quercus* (Fagaceae) species native to the USA or China. *Ann. Bot.* 14, 1747–1759.