

EL USO DE LA BIOTECNOLOGÍA EN LA CONSERVACIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS FORESTALES

M. TORIBIO, C. CELESTINO

Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria (IMIA)
Finca «El Encín». Apdo. 127. 28800 Alcalá de Henares (Madrid)
mariano.toribio@imia.comadrid.es

RESUMEN

En el mundo actual, en el que la creciente demanda de productos agrarios así como las necesidades de materias primas y presiones medioambientales cambiantes ponen en riesgo los ecosistemas naturales, especialmente los ecosistemas forestales, es muy importante el conocimiento y la conservación de los recursos forestales. Para la gestión de los Recursos Genéticos Forestales (RGF), la Biotecnología ofrece nuevas técnicas que complementan a las metodologías tradicionales de la Mejora Genética Forestal.

Los importantes avances de las técnicas de la Biología Molecular y del Cultivo de Tejidos Vegetales que han tenido lugar en las dos últimas décadas, se encuentran en la base del desarrollo de campos tales como el de los marcadores de ADN, la genómica de árboles, la transformación genética, la crioconservación y la regeneración de plantas (expresión de la totipotencia celular).

En el ámbito de los recursos genéticos, los marcadores de ADN están permitiendo caracterizar la naturaleza, amplitud y distribución de la variabilidad natural de especies vegetales, y por tanto facilitando la toma de decisiones sobre qué y cómo conservar. La crioconservación y la regeneración de plantas se están utilizando para conservar y micropropagar material vegetal específico, a fin de llevar a cabo la conservación *ex situ* y permitir el desarrollo de la silvicultura clonal.

En este trabajo se realiza una revisión de las aplicaciones de estos campos a las especies forestales. En este contexto se aporta información sobre la actividad de grupos de investigación españoles que trabajan con especies Ibéricas.

PALABRAS CLAVE: Biotecnología
Conservación de germoplasma
Marcadores

INTRODUCCIÓN

El aumento de la población en el mundo, así como el necesario incremento en la calidad de vida de sus habitantes, particularmente en los países en vías de desarrollo, está generando un aumento considerable en las demandas de productos de la agricultura y la silvicultura. Por ello se está incrementando la presión sobre los bosques, causando un considerable problema medioambiental. Como resultado de la Conferencia de la ONU sobre

medio ambiente celebrada en Río de Janeiro (1992), se prevé tanto un aumento del reciclaje de los materiales procedentes del bosque, como de las plantaciones forestales de producción intensiva, en las que la mejora (genética y cultural) juegue un papel primordial (Pâques, 1999).

En una circunstancia como la descrita, en un mundo con necesidades y presiones medioambientales cambiantes, en el que la producción intensiva tiene que jugar un papel fundamental, se hace muy necesario el conocimiento y la conservación de los recursos genéticos.

La biotecnología ofrece nuevas herramientas que se suman a las clásicas de la selvicultura, para cumplir los dos objetivos básicos de la gestión forestal actual: mantenimiento de la diversidad de los bosques naturales para la conservación y la utilización de los recursos genéticos, y mejora genética ligada a la mejora cultural en las plantaciones forestales. También ofrece herramientas específicas para la conservación *ex situ*.

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL, MEJORA Y CONSERVACIÓN FORESTAL

Se denomina Biotecnología, en un sentido amplio, al conjunto de técnicas que utilizan a los seres vivos o sus propiedades para la producción de bienes. La biotecnología actual proporciona diversas herramientas para un mejor conocimiento de las características genéticas del ser vivo utilizado en las actividades forestales, el árbol, así como para producir en masa plantas mejoradas y para conservar dichos recursos genéticos. Las aplicaciones biotecnológicas se basan en dos grandes campos de actividad, frecuentemente interconectados. Por una parte, las técnicas y metodologías propias de la Biología Molecular han dado origen al campo de los marcadores, especialmente de ADN, al de la genómica de árboles y al de la transformación genética. La tecnología del cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos, ha permitido el desarrollo de técnicas de conservación de material vegetal, particularmente de crioconservación, así como de la posibilidad de regenerar plantas completas expresando las propiedades de totipotencia celular. Todas estas biotecnologías de aplicación se están impulsando con gran fuerza en el ámbito agrícola, existiendo ya numerosas aplicaciones comerciales, y se están empezando a implementar en el sector forestal. Dos recientes Congresos Internacionales, uno celebrado en Oxford (Reino Unido de Gran Bretaña) en julio de 1999, denominado «Forest Biotechnology «99» y otro efectuado en Vitoria-Gasteiz (España) en septiembre del mismo año bajo el nombre de «Biofor»99: Applications of Biotechnology to Forest Genetics», dan idea de los distintos campos de actividad que se están abordando en relación a las especies forestales y de la amplitud de equipos que trabajan en los mismos.

La conservación de recursos genéticos forestales se beneficia fundamentalmente de los desarrollos en los ámbitos de marcadores, como medio para conocer la amplitud y la distribución de la variabilidad genética a conservar. También de la crioconservación y de la regeneración de plantas, como medios para la conservación *ex situ* y para la puesta en práctica de la forestación clonal.

APLICACIONES DERIVADAS DE LAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Marcadores

A lo largo de los últimos diez años se han ido aplicando al ámbito forestal diferentes marcadores que revelan polimorfismos en la secuencia de bases del ADN, permitiendo por tanto abordar la variación a nivel del genoma. A continuación se describen algunas de sus aplicaciones relacionadas con la conservación de recursos genéticos.

Caracterización de especies, variedades, cultivares y clones

La biotecnología ofrece para la caracterización dos tipos de marcadores fundamentales: RAPDs y AFLPs.

Los RAPDs se han usado para caracterizar clones, entre otras, en especies de los géneros *Populus* y *Salix* (Lin *et al.*, 1994). De igual manera, se han determinado marcadores RAPD para la distinción de clones de diversas especies de *Populus* plantados en España, así como para identificar a diferentes árboles de *Populus tremula* procedentes de distintas localidades (Sánchez *et al.*, 1999). Como ejemplos de la utilización de marcadores AFLP se pueden citar: la caracterización de especies, variedades y cultivares de *Castanea* (Yamamoto *et al.*, 1998), y la caracterización de clones y determinación de la variabilidad en *Salix* (Barker *et al.*, 1999). Usando estos últimos marcadores se han caracterizado catorce clones de *Populus*, trece de ellos incluidos en la regulación española; con los AFLPs revelados no se ha podido encontrar diferencias entre los clones «I-214» y «Campeador», sugiriendo los autores que podría tratarse del mismo genotipo (Agúndez *et al.*, 1999).

Un aspecto particular de la caracterización de clones es la utilización de marcadores para la detección precoz de variación somaclonal. La variación somaclonal puede aparecer cuando se utilizan técnicas de cultivo *in vitro* como medio de propagación vegetativa, sobre todo cuando se siguen vías adventicias a través de callos (Larkin y Scowcroft, 1981). Para revelar la posible incidencia de esta variación a nivel genético se han usado tanto marcadores tipo RAPD, como son los casos de *Picea abies* (Heinze y Schmidt, 1995) y *Quercus suber* (Gallego *et al.*, 1997), como tipo AFLP en *Carya illinoensis* (Vendrame *et al.*, 1999) y en *Quercus suber* (Hornero *et al.*, 2000). Otro proceso que precisa de la evaluación de la estabilidad genética es la crioconservación. A este respecto se han detectado variaciones en el patrón de marcadores RAPD en material crioconservado de *Picea glauca*, posiblemente generadas durante la preparación para la congelación o durante el proceso de descongelación (DeVerno *et al.*, 1999).

Determinación de la magnitud y localización de la variabilidad

En este ámbito se han publicado un gran número de trabajos, uniéndose a los marcadores bioquímicos clásicos, fundamentalmente isoenzimas, los marcadores de ADN tales como RFLPs, RAPDs y SSRs. Utilizando isoenzimas se han realizado estudios sobre la variabilidad de diferentes especies ibéricas tales como *Populus tremula* (López de Here-

dia *et al.*, 1999), *Quercus suber* (Elena-Rosselló y Cabrera, 1996; Jiménez *et al.*, 1999a) y *Pinus pinaster* (González-Martínez *et al.*, 1999). Este último trabajo incluye la comparación entre la variación detectada mediante los marcadores y la observada para caracteres como supervivencia, forma del tronco y crecimiento en ensayos de procedencias, mostrando gran divergencia.

Mediante RAPDs se han estudiado las relaciones genéticas de la población de *Pinus radiata* del País Vasco con las de California, así como su variabilidad; se ha determinado que la población local descende probablemente de la californiana de «Año Nuevo», observándose una coherencia en los resultados entre rendimiento en el campo, características fisiológicas y análisis de marcadores (Espinel *et al.*, 1999). Usando también este tipo de marcadores se ha determinado la diversidad genética en nueve poblaciones de *Pinus halepensis*, seis de ellas españolas, y se ha construido un mapa de ligamiento para la especie que será la base para la determinación de QTLs (Gómez *et al.*, 1999a). Utilizando microsatélites (SSRs) se ha estudiado la diversidad genética dentro y entre rodales semilleros de *Quercus robur* y *Quercus petraea* en España, lo que permitirá un mejor conocimiento y control del material para reproducción (Olalde *et al.*, 1999). También mediante el análisis de microsatélites de cloroplasto, de individuos procedentes de seis poblaciones de *Pinus halepensis*, se ha estudiado la distribución de la variabilidad de la especie en España, detectándose hasta nueve haplotipos, lo que ha permitido postular la historia de dichas poblaciones (Gómez *et al.*, 1999b).

Otros marcadores de ADN como los de tipo AFLP se han empleado también con el propósito de caracterizar la variabilidad. Así, por ejemplo, en *Moringa oleifera*, un árbol con múltiples aplicaciones introducido en África desde la India a principios de siglo, estos marcadores han revelado diferencias muy significativas entre regiones de procedencia y poblaciones (Muluvi *et al.*, 1999). La reconstrucción de bosques en centro-Europa con especies autóctonas, pero utilizando progenies de individuos seleccionados, plantea el problema de establecer la máxima variabilidad con fines de conservación. A estos efectos se han utilizado marcadores tipo RAPD y AFLP para evaluar la variabilidad en semifratrias de árboles seleccionados de *Quercus petraea* (Greef *et al.*, 1998).

Estudios filogenéticos

El análisis de ADN de cloroplastos, mediante marcadores tipo RFLP, después de amplificaciones con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), está sirviendo para establecer las relaciones filogenéticas y filogeográficas en las especies del género *Quercus* (Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997; Manos *et al.*, 1999). Los robles blancos ibéricos se están estudiado aplicando esta metodología, habiéndose encontrado 14 haplotipos pertenecientes a cuatro linajes maternos, y que *Quercus faginea* es la especie que muestra mayor diversidad (Herrán *et al.*, 1999). En *Quercus suber* se han estudiado 33 poblaciones españolas, encontrándose introgresión de *Quercus ilex* (Jiménez *et al.*, 1999b). El análisis de PCR-RFLPs de cloroplasto también se ha aplicado a especies de otros géneros, como es el caso del género *Pistacia*, mostrando que es un género de lenta evolución (Badenes y Parfitt, 1998).

Marcadores RFLP nucleares se han utilizado asimismo para determinar la filogenia en diversas especies y subespecies de *Eucalyptus* en Australia, sugiriendo los resultados que se trata de una única especie muy variable y ampliamente distribuida (Byrne, 1999).

Gestión sostenible

La gestión sostenible de los bosques es una estrategia atractiva, ya que trata de combinar la conservación de la biodiversidad y variabilidad con intereses económicos y fines sociales. La gestión de las poblaciones naturales de una especie presuponen el mantenimiento del dinamismo demográfico y de su estructura genética, así como de las interacciones con otras especies del ecosistema. Para ello, los estudios que versen sobre la autoecología de la especie son muy necesarios, especialmente los que tratan aspectos de la dinámica demográfica y del movimiento de alelos. La caracterización de los niveles de variabilidad y de la estructura genética, así como el conocimiento de la dinámica del movimiento de alelos, proporciona las bases necesarias para la consecución de estrategias que tratan de maximizar el aprovechamiento, al tiempo que se controla el proceso para hacerlo sostenible. Por ello resultan imprescindibles las estimas de índices de diversidad, grado de heterocigosidad, número de alelos por locus, etc. Marcadores tipo isoenzimas, RAPDs y microsatélites (SSRs) proporcionan una ayuda fundamental (Rajora, 1999).

Otro aspecto de interés en la gestión sostenible es la comparación de parámetros genéticos, utilizando marcadores apropiados, entre poblaciones naturales y bosques de aprovechamiento, a fin de identificar cambios genéticos potencialmente deletéreos que pudieran ocurrir como consecuencia de la gestión forestal. Un ejemplo de estudios de este tipo es el llevado a cabo con *Pinus caribea* utilizando isoenzimas y RFLPs de cloroplastos, en el que demostraron niveles similares de variabilidad, pero mayores niveles de consanguinidad en explotaciones comparándolas con masas naturales (Zheng y Ennos, 1999).

Conservación de especies o poblaciones amenazadas

En los últimos años, la protección de la diversidad genética se ha establecido como un objetivo prioritario en los planes de conservación. Se trata, a largo plazo, de mantener la viabilidad evolutiva de las especies y para ello maximizar las posibilidades de supervivencia en un entorno cambiante. Por ello son de gran interés los estudios que evalúan poblaciones naturales para detectar variantes genéticas únicas y / o centros de variabilidad genética para conservar especies amenazadas, diseñando actividades de conservación *in situ* y *ex situ*, y para proteger la integridad de reservas genéticas nativas. En este último caso, se establecerían reservas naturales que pudieran tener variantes genéticas únicas como consecuencia de un flujo de genes reducido (aislamiento), pequeños tamaños de población y regímenes particulares de selección natural que ocasionara una diferenciación de otras poblaciones.

Tal es el caso de *Caesalpinia echinata*, una especie sobreexplotada en Brasil, que se considera amenazada en la costa atlántica; el estudio de pequeñas poblaciones naturales mediante RAPDs ha permitido determinar claras correlaciones entre distancias genéticas y geográficas, identificando áreas de diversidad, necesarias para diseñar planes de conservación (Cardoso *et al.*, 1998).

Evaluación de la dispersión de polen y semillas

Los marcadores de ADN se están utilizando en estudios sobre la dispersión de polen y semillas. Esta característica, que condiciona factores tales como el parentesco y sus relaciones con las progenies, tiene una fuerte influencia sobre la estructura genética de las especies. Con este fin se han desarrollado marcadores SSR en especies tales como *Camelia japonica* (Ueno *et al.*, 1999). En la especie *Calycophyllum spruceanum* se han revelado marcadores AFLP para estudiar el reparto de la variación dentro y entre poblaciones mediante análisis de la varianza molecular (AMOVA), tratando de encontrar una estructuración ligada a distancias geográficas y determinada por la dispersión de las semillas (Russell *et al.*, 1999).

APLICACIONES DERIVADAS DE LAS TÉCNICAS DE CULTIVO *IN VITRO*

Crioconservación

La crioconservación de germoplasma comienza a ser una herramienta de gran utilidad para la conservación de recursos fitogenéticos. Un informe reciente del International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) indica que las técnicas basadas en el cultivo *in vitro* se están haciendo imprescindibles para la conservación *ex situ* y el intercambio de germoplasma de las especies que se propagan vegetativamente o que tienen semillas recalcitrantes (Ashmore, 1997). Más de cuarenta géneros y sesenta especies de plantas leñosas han sido objeto, en los últimos diez años, de intensos estudios para lograr protocolos fiables de crioconservación. El paso más crítico para lograr un protocolo viable es reducir el contenido de humedad del material a conservar y/o evitar la formación de cristales de hielo. En general, las semillas, los embriones y los ejes embriónicos se crioconservan previa deshidratación por aire, los ápices y meristemos se someten a un proceso de vitrificación o encapsulación-deshidratación, y los callos y cultivos en suspensión se tratan con un proceso en dos pasos o vitrificación.

El material más habitual para crioconservar es el de las especies que se propagan vegetativamente, pudiendo interesar la conservación de clones específicos con características de interés. Es el caso de genotipos de *Populus alba*, en los que se ha desarrollado un protocolo de crioconservación de yemas axilares utilizando la técnica de vitrificación como elemento crioprotector que logra porcentajes de supervivencia del 90 % (Caccavale *et al.*, 1998).

Especies que se propagan habitualmente por semilla, pero que se encuentran amenazadas por alguna causa y con riesgo de extinción, son también objeto de prácticas de crioconservación. Un caso es la especie *Juglans cinerea*, que en Norteamérica está catalogada como en peligro debido a la enfermedad del hongo *Sirococcus clavigignenti-juglandacearum*; para esta especie se han desarrollado protocolos de conservación utilizando ejes embriónicos sometidos a desecación lenta (Beardmore y Vong, 1998).

Se están desarrollando también protocolos para especies con semillas recalcitrantes: en el caso del género *Quercus* se ha logrado recuperar el crecimiento de ejes embriónicos

de *Q. suber* y *Q. ilex* encapsulados en cuentas de alginato (González-Benito *et al.*, 1999). En diversas especies se han puesto a punto métodos de crioconservación para mantener material valioso procedente de cultivo *in vitro*. En la especie tropical *Guazuma crinita* se ha logrado la recuperación tras inmersión en nitrógeno líquido de explantos consistentes en agrupamientos de yemas adventicias, mediante tratamiento previo de encapsulación-vitrificación (Maruyama *et al.*, 1998).

La aplicación actual más importante de la crioconservación en especies forestales es la que la incluye en las estrategias de control del cambio de fase, para desarrollar la denominada forestación clonal de alto valor («high-value clonal forestry»). Es una forma particular de conservación de recursos genéticos para su utilización en programas de mejora. Esta aplicación se debe a dos factores. Por una parte, al hecho de que, en la gran mayoría de especies forestales, el cambio de fase entre las condiciones de juvenilidad y madurez condiciona fuertemente las capacidades morfogénicas, llegando a hacer prácticamente imposible la propagación vegetativa de árboles adultos. Por otra parte, las malas correlaciones entre caracteres de interés en estados juvenil y adulto impide la selección precoz. La crioconservación, como parte del desarrollo de la forestación clonal, se basa en la buena aptitud de los embriones somáticos y de los cultivos embriogénicos para soportar el almacenamiento en nitrógeno líquido, así como en su gran capacidad de multiplicación posterior, aplicándose actualmente de forma preponderante en el caso de las coníferas (Park *et al.*, 1998). A partir de semillas procedentes de cruzamientos controlados (que son caras, escasas y en las que ya se puede obtener una determinada ganancia genética), se generan con facilidad líneas embriogénicas de las que se pueden obtener plantas clónicas. Mientras dichas plantas procedentes de muchos clones se plantan para evaluación en ensayos clonales, las respectivas líneas embriogénicas se introducen en crioconservación. Al cabo de los años, cuando ha concluido la evaluación, se dispone del material base para iniciar una multiplicación rápida de los mejores clones debido al mantenimiento del pleno potencial embriogénico.

Regeneración de plantas

La regeneración de plantas se está utilizando como un medio para lograr la amplificación rápida de individuos que se encuentran en poblaciones amenazadas, a fin de iniciar su conservación *ex situ*. La intensa presión que han sufrido en las últimas décadas las regiones tropicales ha conducido a la desaparición de algunas especies forestales y a poner a otras al borde de la extinción. Se están llevando a cabo trabajos con especies tales como *Santalum album* y *Pterocarpus santalinus* para lograr su regeneración *in vitro*, como medio de multiplicación con fines de conservación (Muruges *et al.*, 1999).

La regeneración se puede lograr por dos vías: organogénesis y embriogénesis somática. La primera vía es la más clásica, habiéndose publicado cientos de trabajos desde los inicios del cultivo *in vitro*, siendo la que ha llevado a estas técnicas al ámbito comercial de las plantas ornamentales. La forma más común de regeneración, y la que presenta mayores garantías de estabilidad genética, es la inducción del desarrollo de yemas axilares, seguida del enraizamiento de las mismas (Frampton *et al.*, 1998; Deshpande *et al.*, 1998). En España diversos grupos de investigación han abordando esta vía de regeneración con diferentes especies y con objetivos tanto de propagación clonal como de regeneración después de transformación. Entre otras, se han tratado las siguientes especies: *Eucalyptus globulus* (Villar *et al.*, 1999; Bernardo *et al.*, 1999), *Castanea sativa* y el híbrido *C. sativa x crenata* (Ballester *et al.*, 1999), *Quercus robur* (Vieitez *et al.*, 1994; Barceló-Muñoz *et*

al., 1999), *Fagus sylvatica* y *F. orientalis* (Vieitez y San José, 1996; Cuenca y Vieitez, 1999), *Ulmus minor* y el híbrido *U. minor x pumilla* (Díez y Gil, 1999), y *Pinus pinea* (García-Férriz *et al.*, 1994; Ordás y Humara, 1999).

La embriogénesis somática se está configurando como la opción más apropiada para la regeneración de plantas en especies forestales. En primer lugar presenta unas elevadas tasas de multiplicación mediante embriogénesis secundaria o recurrente (Fernández-Guijarro *et al.*, 1995), lo que asegura la rápida amplificación de individuos seleccionados. Por otra parte, los cultivos embriogénicos suelen presentar una aceptable capacidad para la crioconservación, manteniendo todo su potencial de propagación (Park *et al.*, 1998) y buena estabilidad genética (Vasil, 1995; Gallego *et al.*, 1997). En la actualidad existen publicados protocolos de regeneración por embriogénesis somática en cientos de especies forestales, tanto coníferas (Haggman *et al.*, 1999; Filonova *et al.*, 2000) como frondosas (Endemann y Wilhelm, 1999; Xing *et al.*, 1999). Se ha tratado esta vía de regeneración en algunas especies ibéricas, entre ellas *Quercus suber* (Bueno *et al.*, 1992; Celestino *et al.*, 1999), *Quercus robur* (Cuenca *et al.*, 1999) y *Pinus nigra* (Radojevic *et al.*, 1999). Los problemas más importantes en esta vía de regeneración, con la que se prevé alcanzar la automatización del proceso y por tanto su abaratamiento, radican en la necesidad de lograr cultivos sincrónicos, mejorar el proceso de maduración y lograr la inducción en tejidos procedentes de árboles adultos (Merkle, 1995). En la actualidad, la especie más desarrollada en relación a estas técnicas es la palmera de aceite (*Elaeis guineensis*), de la que existen plantaciones productivas (Khaw *et al.*, 1998). Otras especies, fundamentalmente coníferas, como *Pinus radiata*, *Pseudotsuga menziesii*, *Picea glauca* y *Picea abies* (Timmis, 1998), pero también algunas frondosas, como *Hevea brasiliensis* (Carron *et al.*, 1998), tienen establecidos desde hace unos años ensayos clonales. En los últimos años están apareciendo trabajos que indican la posibilidad de obtener embriogénesis somática a partir de individuos adultos (Toribio *et al.*, 2000). Ello abrirá la posibilidad para la conservación *ex situ* de individuos que tienen dificultades de reproducción sexual y presentan riesgo de extinción.

SUMMARY

The role of biotechnology in forest genetic resource conservation

In today's world, in which the increasing demand of agricultural products and the changing needs of raw materials and environmental pressures are threatening all natural ecosystems, particularly the forest ecosystems, is specially important the knowledge and conservation of forest resources. Biotechnology offers new tools for complementing classical Forest Tree Improvement methodologies in order to manage Forest Genetic Resources (FGR).

The impressive achievements of the techniques of Molecular Biology and Plant Tissue Culture in the last two decades are in the background of the development of fields such as DNA markers, tree genomics, genetic transformation, criopreservation and plant regeneration (expression of cellular totipotency).

Particularly suitable for application to genetic resources are DNA markers, so that the nature, extent and distribution of natural variability of plant species can be assessed at the genome level, and therefore aiding in decisions about what and how to conserve. Criopreservation and plant regeneration are useful to conserve and micropropagate specific plant material for *ex situ* conservation and developing high-value clonal forestry.

Different applications of these tools to forest trees are reviewed. The research work of Spanish groups dealing with Iberian species is placed in this context.

KEY WORDS: Biotechnology
Germplasm Conservation
Genetic markers

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÚNDEZ D., CERVERA M.T., ALBA N., MARTÍNEZ-ZAPATER J.M., GRAU J.M., 1999. Genetic identification of commercial clones of *Populus* based on isozymes and AFLPs. En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 549-552.
- ASHMORE S.E., 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Roma, Italy.
- BADENES M.L., PARFITT D.E., 1998. Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome. NUCIS-Newsletter, 7: 25-26.
- BALLESTER A., SAN-JOSÉ M.C., VIDAL N., FERNÁNDEZ-LORENZO J.L., VIEITEZ A.M., 1999. Anatomical and biochemical events during the rooting *in vitro* of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut. Annals of Botany, 83: 619-629.
- BARCELÓ-MUÑOZ A., SIMÓN-PÉREZ E., ENCINA C.L., PLIEGO-ALFARO F., 1999. Effect of mineral formulations on proliferation and rooting of *Quercus robur* NL100A and NL100R. En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 251-253.
- BARKER J.H.A., MATTHES M., ARNOLD G.M., EDWARDS K.J., AHMAN I., LARSSON S., KARP A., 1999. Characterisation of genetic diversity in potential biomass willows (*Salix* spp.) by RAPD and AFLP analyses. Genome, 42: 173-183.
- BEARDMORE T., VONG W., 1998. Role of the cotyledonary tissue in improving low and ultralow temperature tolerance of butternut (*Juglans cinerea*) embryonic axes. Canadian Journal of Forest Research, 28: 903-910.
- BERNARDO S., MAJADA J.P., ASTORGA R., RODRÍGUEZ R., 1999. Effect of hormonal balance on propagation, rooting and micrografting of *Eucalyptus globulus*. En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 237-243.
- BUENO M.A., ASTORGA R., MANZANERA J.A., 1992. Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Quercus suber*. Physiologia Plantarum, 85: 30-34.
- BYRNE M., 1999. High genetic identities between three oil mallee taxa, *Eucalyptus kochii* ssp. *kochii*, ssp. *pleinissima* and *E. horistes*, based on nuclear RFLP analysis. Heredity, 82: 205-211.
- CACCAVALE A., LAMBARDI M., FABBRI A., SCANNERINI S. (ED.), BAKER A. (ED.), CHARLWOOD B.V. (ED.), DAMIANO C. (ED.), FRANZ C. (ED.), GIANINIZZI S., 1998. Cryopreservation of woody plants by axillary bud vitrification: a first approach with poplar. Acta Horticulturae, 457: 79-83.
- CARDOSO M.A., PROVAN J., POWELL W., FERREIRA P.C.G., DE OLIVEIRA D.E., 1998. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae). Molecular Ecology, 7: 601-608.
- CARRON M.P., LARDET L., DEA B.G., 1998. *Hevea* micropropagation by somatic embryogenesis. Plantations, Recherche, Developpement, 5: 187-192.
- CELESTINO C., FERNÁNDEZ GUIJARRO B., HERNÁNDEZ I., MOLINAS M., PUIGDERRAJOLS P., MARTÍNEZ I., HORNERO J., GALLEGO F.J., MANJÓN J.L., DíEZ J., TORIBIO M., 1999. Somatic embryogenesis in cork oak (*Quercus suber* L.). En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 195-197.
- CUENCA B., VIEITEZ A.M., 1999. Histological study of *in vitro* development of adventitious buds on leaf explants of oriental beech (*Fagus orientalis* Lipsky). In Vitro Cell and Developmental Biology - Plant, 35: 326-332.
- CUENCA B., SAN JOSÉ M.C., MARTÍNEZ M.T., BALLESTER A., VIEITEZ A.M., 1999. Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. Plant Cell Reports, 18: 538-543.
- DE VERNO L.L., PARK Y.S., BONGA J.M., BARRETT J.D., 1999. Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clones of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss.). Plant Cell Reports, 18: 948-953.
- DESHVANDE S.R., JOSEKUTTY P.C., PRATHAPASENAN G., 1998. Plant regeneration from axillary buds of a mature tree of *Ficus religiosa*. Plant Cell Reports, 17: 571-573.
- DÍEZ J., GIL L., 1999. Culturing of elm cell tissues within the Spanish breeding programme against Dutch elm disease. En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 307-311.
- DUMOLIN-LAPÈGUE S., DEMESURE B., FINESCHI S., LE CORRE V., AND PETIT R.J., 1997. Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. Genetics, 146: 1475-1487.

- ELENA-ROSSELLÓ J.A., CABRERA E., 1996. Isozyme variation in natural populations of cork-oak (*Quercus suber* L.). *Silvae Genetica* 45: 229-235.
- ENDEMANN M., WILHELM E., 1999. Factors influencing the induction and viability of somatic embryos of *Quercus robur* L. *Biologia Plantarum*, 42: 499-504.
- ESPINEL S., ARAGONÉS A., RITTER E., 1999. Application of RAPD markers to analyse genetic relationships and variability of *Pinus radiata* populations. En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 107-114.
- FERNÁNDEZ-GUIJARRO B., CELESTINO C., TORIBIO M., 1995. Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic embryos from leaves of *Quercus suber* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 41: 99-106.
- FILONOVA L.H., BOZHKOVA P.V., ARNOLD S. VON, 2000. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *Journal of Experimental Botany*, 51: 249-264.
- FRAMPTON L.J. JR, AMERSON H.V., LEACH G.N., 1998. Tissue culture method affects *ex vitro* growth and development of loblolly pine. *New Forests*, 16: 125-138.
- GALLEGO F.J., MARTÍNEZ I., CELESTINO C., TORIBIO M., 1997. Testing somaclonal variation using RAPDs in *Quercus suber* L. somatic embryos. *International Journal of Plant Sciences*, 158: 563-567.
- GARCÍA-FÉRRIZ L., SERRANO L., PARDOS, J.A., 1994. In vitro shoot organogenesis from excised mature cotyledons and microcuttings production in stone pine. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 36: 135-140.
- GÓMEZ A., ARAVANOPULUS P.A., ALÍA R., BUENO M.A., 1999a. *Pinus halepensis* RAPD markers: Linkage and genetic diversity. En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 143-146.
- GÓMEZ A., BUENO M.A., ALÍA R., VENDRAMIN G.G., 1999b. Aleppo pine populations history in Spain revealed by cpSSRs. En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 137-140.
- GONZÁLEZ-BENITO M.E., HERRADON E., MARTÍN C., 1999. The development of a protocol for the encapsulation-desiccation and in vitro culture of embryonic axes of *Quercus suber* L. and *Q. ilex* L. *Silvae Genetica*, 48: 25-28.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ S.C., ALÍA R., GIL L., 1999. Genetic differentiation in 19 native populations of *Pinus pinaster* Ait.: A comparison of molecular and quantitative traits. En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 115-117.
- GREEF B. DE, TRIEST L., CUYPER B. DE, SLYCKEN J. VAN, 1998. Assessment of intraspecific variation in halfsibs of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. «plus» trees. *Heredity*, 81: 284-290.
- HAGGMAN H., JOKELA A., KRAJNAKOVA J., KAUPPI A., NIEMI K., ARONEN T., 1999. Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction. *Journal of Experimental Botany*, 50: 1769-1778.
- HEINZE B., SCHMIDT J., 1995. Monitoring genetic fidelity vs somaclonal variation in Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryogenesis by RAPD analysis. *Euphytica*, 85: 341-345.
- HERRÁN A., ESPINEL S., GOICOECHEA P.G., 1999. Utilización del polimorfismo del ADN de cloroplastos para definir regiones de procedencia materna en los robles blancos de la Península Ibérica. *Investigación Agraria; Sistemas y Recursos Forestales* 8: 139-150.
- HORNERO J., MARTÍNEZ I., CELESTINO C., GALLEGO F.J., TORRES V., TORIBIO M., 2000. Early checking of genetic stability of cork oak somatic embryos by AFLP analysis. *International Journal of Plant Sciences* (aceptado).
- JIMÉNEZ P., AGÜNDEZ D., ALÍA R., GIL L., 1999a. Genetic variation in central and marginal populations of *Quercus suber* L. *Silvae Genetica*, 48: 278-284.
- JIMÉNEZ P., GIL L., PETIT R.J., 1999b. Analysis of cpDNA variation in *Quercus suber* and *Q. ilex* populations. En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 141-142.
- KHAW C.H., NG S.K., DREW R.A., 1998. Performance of commercial scale clonal oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plantings in Malaysia. *Acta Horticulturae*, 461: 251-258.
- LARKIN P.J., SCOWCROFT W.R., 1981. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60: 197-214.
- LIN D., HUBBES M., ZSUFFA L., 1994. Differentiation of poplar and willow clones using RAPD fingerprints. *Tree Physiology*, 14: 1097-1105.
- LÓPEZ DE HEREDIA U., DE LUCAS A-I., SIERRA R., CRISTÓBAL M-D., 1999. Isozyme variation in *Populus tremula* L. in Palencia (Northern Spain). En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 105-106.

- MANOS P.S., DOYLE J.J., NIXON K.C., 1999. Phylogeny, biogeography, and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (Fagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12: 333-349.
- MARUYAMA E., ISHII K., KINOSHITA I., 1998. Alginate encapsulation technique and cryogenic procedures for long-term storage of the tropical forest tree *Guazuma crinita* Mart. in vitro cultures. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 32: 301-309.
- MERKLE S.A., 1995. Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1: 112-121.
- MULUVI G.M., SPRENT J.I., SORANZO N., PROVAN J., ODEE D., FOLKARD G., MCNICOL J.W., POWELL W., 1999. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of genetic variation in *Moringa oleifera* Lam. *Molecular Ecology*, 8: 463-470.
- MURUGESH M., PARTHIBAN K.T., SURENDRAN C., BUVANESWARAN C., 1999. Tissue culture - a tool for the conservation of endangered tree species. *Advances in Horticulture and Forestry*, 6: 187-191.
- OLALDE M., HERRÁN A., LÓPEZ DE HEREDIA U., ESPINEL S., GOICOECHEA P.G., 1999. Molecular biodiversity of white oaks in the Iberian peninsula. En: *Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics*. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 49-50.
- ORDÁS R.J., HUMARA J.M., 1999. Transformation studies in stone pine. En: *Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics*. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 353-368.
- PÂQUES M., 1999. Industrial applications of Forest Biotechnology. En: *Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics*. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 525-526.
- PARK Y.S., BARRET J.D., BONGA J.M., 1998. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control and stability of cryopreserved clones. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 34: 231-239.
- RADOJEVIC L., ÁLVAREZ C., FRAGA M.F., RODRÍGUEZ R., 1999. Somatic embryogenic tissue establishment from mature *Pinus nigra* Arn. ssp. *salzmannii* embryos. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 35: 206-209.
- RAJORA O.P., 1999. Molecular biology in sustainable forest management. En: *Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics*. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 29-39.
- RUSSELL J.R., WEBER J.C., BOOTH A., POWELL W., SOTELO-MONTES C., DAWSON I.K., 1999. Genetic variation of *Calycophyllum spruceanum* in the Peruvian Amazon Basin, revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. *Molecular Ecology*, 8: 199-204.
- SÁNCHEZ N., GRAU M., MANZANERA J.M., BUENO M.A., 1999. RAPD markers for the identification of *Populus* species and *P. tremula* clones. En: *Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics*. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 125-128.
- TIMMIS R., 1998. Bioprocessing for tree production in the forest industry: conifer somatic embryogenesis. *Biotechnology Progress*, 14: 156-166.
- TORIBIO M., CELESTINO C., GALLEGO J., MARTÍNEZ I., 2000. Induction of somatic embryogenesis in tissues from mature oak trees. In: *Development of Integrated Systems for large-scale Propagation of elite Plants using In Vitro Techniques*. Ó Ríordáin, F., ed. COST Action 822: Report of activities, 1998. European Communities, EUR 19237, pp. 236-237.
- UENO S., YOSHIMARU H., TOMARU N., YAMAMOTO S., 1999. Development and characterization of microsatellite markers in *Camellia japonica* L. *Molecular Ecology*, 8: 335-338.
- VASIL I.K., 1995. Cellular and molecular genetic improvement of cereals. In: *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. Terzi, M., Cella, R., Falavigna, A., eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 5-18.
- VENDRAME W.A., COCHERT G., WETZSTEIN H.Y., 1999. AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos. *Plant Cell Reports*, 18: 853-857.
- VIEITEZ A.M., SÁNCHEZ M.C., AMO-MARCO J.B., BALLESTER A., 1994. Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 37: 287-295.
- VIEITEZ A.M., SAN JOSÉ M.C., 1996. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. *In Vitro Cell and Developmental Biology*, 32: 140-147.
- VILLAR B., OLLER J.J., TEULIERES C., BOUDET A.M., GALLEGO P.P., 1999. *In planta* transformation of adult clones of *Eucalyptus globulus* spp using an hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain. En: *Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics*. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 373-385.

- XING Z.Z., POWELL W.A., MAYNARD C.A., 1999. Development and germination of American chestnut somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 57: 47-55.
- YAMAMOTO T., SHIMADA T., KOTOBUKI K., MORIMOTO Y., YOSHIDA M., 1998. Genetic characterization of Asian chestnut varieties assessed by AFLP. *Breeding Science*, 48: 359-363.
- ZHENG Y.Q., ENNOS R.A., 1999. Genetic variability and structure of natural and domesticated populations of Caribbean pine (*Pinus caribaea* Morelet). *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 765-771.