

Bosque

ISSN: 0304-8799

revistabosque@uach.cl

Universidad Austral de Chile

Chile

SANCHEZ-OLATE, MANUEL; RIOS, D.; PEDRAZA, M.; PEREIRA, G.; CASTELLANOS, H.;
ESCOBAR, R.

Propagación in vitro de *Nothofagus procera* ((Poepp. et Endl.) Oerst.) a partir de embriones aislados

Bosque, vol. 25, núm. 1, 2004, pp. 123-128

Universidad Austral de Chile

Valdivia, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173114404011>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

NOTA TECNICA

Propagación *in vitro* de *Nothofagus procera* ((Poepp. et Endl.) Oerst.) a partir de embriones aislados

In vitro propagation of *Nothofagus procera* ((Poepp. et Endl.) Oerst.) from isolated embryos

MANUEL SANCHEZ-OLATE¹, D. RIOS¹, M. PEDRAZA¹, G. PEREIRA²,
H. CASTELLANOS¹, R. ESCOBAR¹.

¹Laboratorio de Biotecnología Forestal, Departamento Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales,
Universidad de Concepción, Concepción, Chile. E-mail: msanche@udec.cl

²Departamento Forestal, Unidad Académica Los Angeles, Universidad de Concepción, Los Angeles, Chile.

SUMMARY

In vitro propagation of *Nothofagus procera* was studied in MS and BTM culture media using mature embryos as the initiation material. Even at the embryonal establishment phase, there was no statistical difference between two media and the MS medium was selected because it produced more vigorous microseedlings. In the following proliferation phase, the results showed that hormonal treatments, in particular 0.5 mg/l of BAP and 0.05 mg/l of IBA, were better for the induction of buds and shoots. There were not many growth points observed at this concentration, which was improved by increasing the hormonal concentration to 0.5 mg/l of BAP and 0.07 mg/l of IBA. However, the manifestation and growth of the induced organs was significantly better in MS medium without hormones, which also spontaneously formed roots.

Key words: *Nothofagus procera*, embryo culture, auxins, cytokinins.

RESUMEN

Se estudió la propagación *in vitro* de *Nothofagus procera* sobre los medios de cultivo MS y BTM usando embriones maduros como material inicial. En la fase de establecimiento embrionario, pese a no haber diferencias estadísticas, se optó por el medio MS, ya que en éste las microplántulas mostraron mayor vigor. En una posterior etapa de proliferación, los resultados mostraron que los tratamientos hormonales, en especial 0,5 mg/l de BAP y 0,05 mg/l de AIB son significativamente mejores para la inducción de yemas y tallos. Se observó que muchos puntos de crecimiento no elongaron a estas concentraciones, lo cual se superó al estrechar la relación citoquinina/auxina a 0,5 mg/l de BAP más 0,07 mg/l de AIB. Sin embargo, la manifestación y crecimiento de los órganos inducidos es significativamente mejor en medio MS sin hormonas, donde se logra, incluso, rizogénesis adventicia en forma espontánea.

Palabras claves: *Nothofagus procera*, cultivo de embriones, auxinas, citoquininas.

INTRODUCCION

El Raulí (*Nothofagus procera* (Poepp. et Endl.) Oerst.) es un árbol endémico de los bosques subantárticos (1), el cual junto con Roble (*N. obliqua*) forma renovaless que representan la reserva potencial más rica del bosque chileno (2). Esta especie se reproduce naturalmente vía semillas, las que requieren de suelo mineral expuesto y protección de la radiación solar directa, produciéndose

la germinación alrededor de los 15 días (1). En promedio, un kilogramo de semillas posee alrededor de 127.000 unidades, con un 40% de capacidad germinativa (3).

Además de las formas tradicionales de propagación de plantas, vía semillas o estacas, la micropropagación *in vitro* es una herramienta que, aunque menos popular, no es menos ventajosa, permitiendo altas tasas de multiplicación en un corto tiempo, haciendo posible la propagación durante

todo el año con una producción programada y facilitando el control de organismos patógenos (4). De esta manera, además de permitir la producción de clones para el establecimiento de plantaciones con características homogéneas en un corto plazo, la micropagación puede representar una alternativa para rescatar especies valiosas que van camino a la extinción.

El cultivo de embriones implica el aislamiento de un embrión y su germinación *in vitro*, con el fin de obtener una planta viable, pudiendo tener varias utilidades como el acortamiento del ciclo de mejora, prevención de aborto embrionario, superación de la incompatibilidad, producción de haploides, entre otros (5). Por otra parte, esta técnica es útil para inducir la germinación de semillas maduras en letargo, superando las restricciones ocasionadas por la cubierta de la semilla o del endospermo (4). El estado de desarrollo en que se encuentren los embriones es de vital importancia, ya que determina los requerimientos necesarios del medio de cultivo a utilizar. Así, el cultivo de embriones inmaduros normalmente da paso a un proceso de embriogénesis somática continua, en vez de una germinación precoz (5); en cambio, los embriones maduros son más competentes para dar origen a procesos organogénicos (4). En Chile, la propagación de embriones cigóticos maduros ha sido ampliamente utilizada para propagar, entre otras especies, a *Gomortega keule* (6), *Gevuina avellana* (7), *Araucaria araucana* (8), *Castanea sativa* (9, 10), *Pitavia punctata* (11, 12) y *Pinus radiata* (13, 14).

En este trabajo se analiza la micropagación de Raulí por medio del cultivo de embriones maduros aislados, con el fin de determinar el medio de cultivo óptimo para la propagación de la especie y establecer las concentraciones hormonales adecuadas en la fase de proliferación, para la obtención de microtallos enraizables.

MATERIAL Y METODOS

El ensayo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Forestal de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Concepción. Como material vegetal inicial se utilizaron semillas de Raulí, cosechadas en el año 1999, procedencia Jauja, árbol plus N° 5 código 11. Estas se mantuvieron en remojo en agua corriente durante 48 horas, para extraer con facilidad la testa de la semilla y evitar el efecto de ciertos compuestos que pudieran inhibir la germinación (15). A continua-

ción, en una cámara de flujo laminar, se inició la asepsia superficial de las semillas mediante lavado en solución de etanol al 70% v/v durante 3 minutos, seguido de tres enjuagues de 2 minutos cada uno, con agua destilada estéril. Luego las semillas fueron inmersas en una solución de hipoclorito de sodio, con un 2% de cloro activo durante 20 minutos, para luego realizar tres enjuagues con agua destilada estéril durante 2 minutos cada uno, todo lo anterior bajo agitación constante. Con la ayuda de pinzas y bisturí, bajo una lupa estereoscópica se procedió a extraer los embriones, los que posteriormente fueron sembrados en tubos de ensayo contenido 15 ml de medio de cultivo gelificado con agar-agar. Estos se mantuvieron en la cámara de crecimiento durante una semana en oscuridad a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, hasta su germinación. Una vez desarrollados los hipocotilos de las plántulas, fueron trasladadas a fotoperíodo de 16 horas e intensidad lumínica de 3.000 lux.

En una primera etapa de establecimiento se utilizó el medio MS (16) y BTM (Broadleaved Tree Medium), ambos con sus macronutrientes diluidos al 50%, ajustando el pH a 5,8. Ambos medios fueron gelificados con agar-agar al 0,7%. En la etapa de proliferación, se evaluó el efecto de la concentración hormonal en la tasa de multiplicación, estudiando 3 fases. En la fase 1 se varió tanto la auxina (AIB) como la citoquinina (BAP); mientras que en la fase 2, sólo varió la concentración de auxina, manteniendo estable la concentración de citoquinina, y la fase 3, sin inclusión de hormonas al medio de cultivo (cuadro 1).

En la etapa de establecimiento se utilizó un diseño experimental completamente al azar, en el cual se compararon dos medios de cultivo (MS y BTM), con el objetivo de determinar diferencias

CUADRO 1

Tratamientos de proliferación según variaciones de la concentración de citoquinina y auxina (mg/l), para fase 1, 2 y 3.

Proliferation treatments according to variations of auxin and cytokinin concentrations, (mg/l), for phases 1, 2 and 3.

Tratamiento	Fase 1	Fase 2	Fase 3
	BAP/AIB	BAP/AIB	BAP/AIB
T0	0,0/0,0	0,0/0,0	0,0/0,0
T1	0,5/0,05	0,5/0,07	0,0/0,0
T2	1,0/0,10	0,5/0,10	0,0/0,0

entre ellos, por medio de análisis de varianza, para experimentos de factor único. Cada tratamiento se repitió quince veces. Como respuesta se evaluó la longitud del tallo (mm) y el número de yemas. En la etapa de proliferación se siguió de la misma forma un diseño experimental completamente aleatorio, utilizando el medio elegido en la etapa anterior. En una primera fase se compararon tres niveles de auxina y citoquinina, considerando como unidad experimental un recipiente con 3 explantes, con 5 repeticiones cada uno. La variable respuesta fue la longitud de los explantes. En la segunda fase se probaron 3 relaciones citoquinina/auxina; en dos casos se mantuvo constante el nivel de citoquinina elegido en la fase 1, elevándose la concentración de auxina. En este caso, se evaluaron la longitud del tallo (mm), el número de yemas y número de tallos nuevos por explante. Por último, en la tercera fase se pasaron todos los explantes obtenidos en las fases anteriores a medio MS con la concentración hormonal mejor evaluada la fase anterior, registrando como respuesta la longitud de los explantes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la etapa de establecimiento, los resultados indican que el número de yemas no se ve afectado por el medio utilizado, porque tanto MS_{1/2} como BTM_{1/2} producen plántulas con igual número de yemas (figura 1).

La evaluación del efecto del medio de cultivo tampoco arrojó diferencias en la longitud de los microtallos, aun cuando MS también fue superior a BTM en esta variable morfológica. Las diferencias entre ambos medios de cultivo se originan principalmente por mayores contenidos de sulfato de amonio (240 mg l⁻¹) y sulfato de potasio (860 mg l⁻¹) en el medio BTM. Estas diferencias entre los medios pueden llevar a una menor expresión de yemas adventicias, pero debido a que se trata de macronutrientes, su efecto es relativamente bajo.

Pese a no existir diferencias significativas entre los dos medios de cultivo probados, se eligió MS para las posteriores fases de la propagación *in vitro* de Raulí.

En la primera fase de la etapa de proliferación, el análisis de varianza indica que no existe diferencia significativa para la variable longitud de explantes entre los tratamientos 0,5/0,05 mg l⁻¹ de BAP/AIB y 1,0/0,1 mg l⁻¹ de BAP/AIB, apreciándose, sin embargo, un mayor desarrollo de los

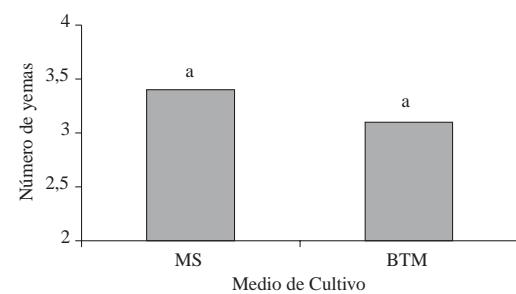


Figura 1. Inducción de yemas adventicias en microtallos de Raulí según el medio de cultivo utilizado. En las barras, letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($\alpha = 0,05$).

Adventitious bud induction in Raulí microshoots according to the culture media. On the bars, the equal letters indicate don't exist significant differences ($\alpha = 0,05$).

explantes en el tratamiento control, existiendo en este caso diferencias significativas con la concentración 1,0/0,1 mg l⁻¹ de BAP/AIB (figura 2). El mayor índice de longitud de explantes confirma que con una baja concentración de citoquinina, o con la ausencia de ésta, se consigue una mayor elongación celular (17).

En estas condiciones de cultivo, los explantes en presencia de hormonas exógenas presentan formación de callo con múltiples puntos de crecimiento, los que forman nuevos explantes que pueden ser excindidos para multiplicación. Este factor hizo que, pese a no existir diferencia estadística entre el tratamiento con 0,5/0,05 mg l⁻¹ de BAP/AIB y el control, se optara por el primero para continuar con la fase siguiente.

Para conseguir la elongación de los puntos de crecimiento en la segunda fase se mantuvo constante la concentración de BAP (0,5 mg l⁻¹), va-

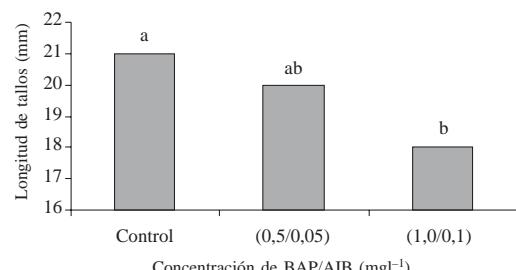


Figura 2. Elongación de explantes de Raulí cultivados en medio MS según variaciones en la concentración de auxinas y citoquininas.

Elongation of Raulí explants cultured in the MS medium according to variations in auxin and cytokinin concentrations.

riendo la concentración de AIB entre 0,07 y 0,1 mg l^{-1} , respectivamente. En estas condiciones, los resultados indican que para la variable longitud de tallo existe un efecto positivo significativo, de reducidas concentraciones de hormona, presentándose diferencias significativas entre los tratamientos Control y 0,5/0,07 mg l^{-1} de BAP y AIB con el tratamiento inicial de 0,5/0,1 mg l^{-1} de BAP/AIB (figura 3).

La elongación caulinar se ve restringida a medida que aumenta la concentración hormonal en el medio de cultivo, situación que ha sido descrita como un indicador de elevados niveles endógenos de reguladores del crecimiento vegetal, especialmente poliaminas (18), los que actúan como cofactores morfogénicos (19). El efecto inhibitorio de la elongación caulinar por un aumento en la concentración exógena de hormonas es diferencial para cada tipo de hormonas (20), con lo cual una reducción de los niveles, ya sea de auxina o citoquinina, tiene efectos distintos.

Los resultados muestran un aumento significativo de la elongación caulinar ante una disminución de la concentración de AIB en el medio de cultivo, generándose diferencias significativas con el tratamiento que mantiene 0,1 mg l^{-1} de AIB en el medio, sin que el resultado de la aplicación de 0,07 mg l^{-1} de AIB resulte en diferencias significativas con el Control, libre de hormonas. Esta reducción de AIB a niveles de 0,07 mg l^{-1} estimula nuevos puntos de crecimiento (figura 4), como efecto de la relativa mayor concentración de BAP, produciéndose finos brotes que acompañan al brote central, mejorando la tasa de proliferación del cultivo. Esta mejora en la tasa de proliferación en el tratamiento 0,5/0,07 mg l^{-1} de BAP/AIB es significativamente mayor a aquella obtenida en los otros tratamientos (figura 6), lo que indica una

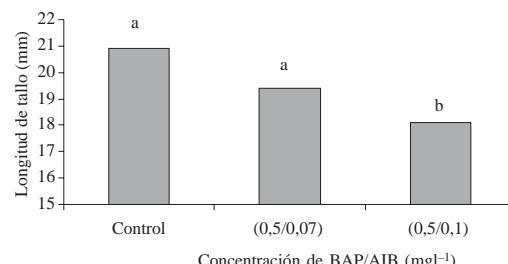


Figura 3. Elongación de explantes de Raulí cultivados en medio MS manteniendo constante la concentración de BAP y reduciendo significativamente AIB.

Elongation of Raulí explants cultured in MS medium, with a same level of BAP and decreasing of IBA concentrations.

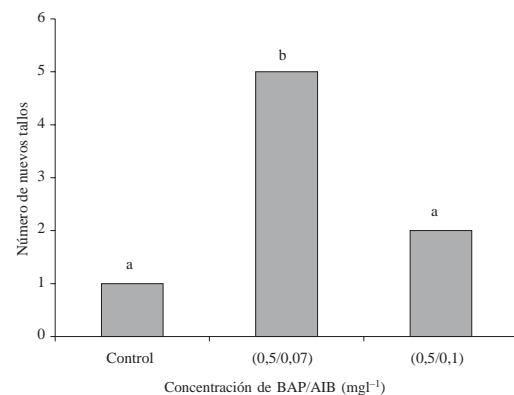


Figura 4. Número de nuevos tallos por explante de raulí después de 40 días de cultivo en medio MS. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas ($\alpha = 0,05$).

Number of new shoots of Raulí explants after 40 days of culture in the MS medium. Different letters on the bars indicate significant differences ($\alpha = 0.05$).

mayor formación de puntos de crecimiento generado por la citoquinina y una mejor elongación y manifestación de estos puntos de crecimiento, como resultado de un balance auxínico adecuado (5).

Por otra parte, a mayores niveles de BAP (1,0 mg l^{-1}) y AIB (0,1 mg l^{-1}) sólo se obtiene un mayor desarrollo de callo en los explantes, sin la aparición de yemas adventicias (figura 5). Cuando se reduce la dosis de hormonas exógenas, la respuesta de los microtallos se expresa en un incremento del número de yemas adventicias, posiblemente como resultado de una reducción del efecto de dominancia apical que inducen las altas concentraciones de hormonas (20). Además, aun cuando las diferencias no son significativas, se observa un mayor número de yemas adventicias en el tratamiento Control, indicando la posibilidad de una mayor reducción de los niveles exógenos de hormonas en esta especie durante el cultivo (figura 5).

El menor número de nuevas yemas del tratamiento 0,5/0,1 mg l^{-1} de BAP/AIB se debe a una expresión de la mayor concentración de auxina y a una saturación de citoquininas (21). Este resultado hace aconsejable cultivar los microtallos en medio base en la fase de desarrollo de yemas u otros puntos de crecimiento.

En la tercera fase de la etapa de proliferación, los explantes fueron cultivados en medio MS libre de hormonas para evitar así la formación de callo y estimular el crecimiento (figura 6a, b). En algunos explantes, a las tres semanas de cultivo en medio base, se origina la formación espontánea de

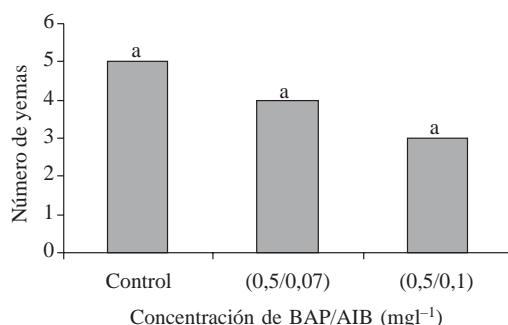


Figura 5. Número de nuevas yemas en microtallos de raulí inducidas en medio MS con diferentes concentraciones de hormonas. Letras iguales sobre las barras indican que no existen diferencias significativas ($\alpha = 0,05$). Number of new buds in microshoots of Raulí induced in MS medium with different hormone concentrations. Equal letters on the bars indicate don't exist significant differences ($\alpha = 0,05$).

raíces (figura 6b). Estos sistemas radiculares muestran características morfológicas normales y facilitan el posterior proceso de aclimatación de plantas. No obstante no haber estudiado el proceso de inducción rizogénica *in vitro* para este tipo de material y especie, los resultados preliminares muestran una fase de manifestación acelerada y un proceso de generación de raíces secundarias completo en un período no superior a 30 días, situación que hace prever una fácil etapa de aclimatación de microplántulas a condiciones *ex vitro*.

A partir de esta fase de cultivo, las tasas de multiplicación son exponenciales, favoreciendo el

establecimiento de cadenas proliferativas de *Nothofagus procera* para la producción masiva de microtallos con características morfofisiológicas adecuadas para el proceso de enraizamiento (figura 6a). Asimismo, la manifestación espontánea de raíces adventicias (figura 6b) permite la selección temprana de líneas clonales con elevado potencial rizogénico, estableciendo mecanismo de selección temprana y la posterior producción de microplántulas.

La fase de elongación caulinar se completa a partir de las tres semanas de cultivo, momento en que los explantos alcanzan una longitud promedio de 22,6 mm (figura 7). El análisis de varianza para esta variable indica que no existe diferencia significativa entre el tratamiento Control y el tratamiento 0,5 mg l⁻¹ de BAP y 0,07 mg l⁻¹ de AIB, pero sí entre éstos y el tratamiento 0,5 mg l⁻¹ de BAP y 0,1 mg l⁻¹ de AIB.

Los resultados de elongación caulinar, de proliferación de yemas adventicias y las características morfofisiológicas de los microtallos logrados después de las fases de inducción hormonal, seguida de una fase de manifestación y elongación, permiten hipotetizar que los *Nothofagus* chilenos responderán positivamente al cultivo *in vitro*, cuando se les aplica una reducida cantidad de hormona exógena al medio de cultivo. De la misma manera, pone de manifiesto la necesidad de estudiar los niveles endógenos de hormonas, para establecer indicadores de la competencia morfogénica de cada tipo de explant y especie.

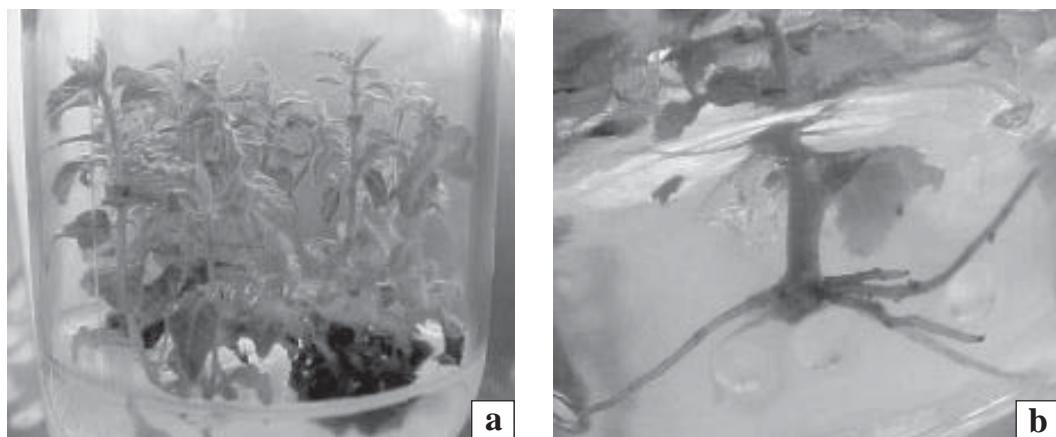


Figura 6. Explantes de raulí después de 21 días de cultivo en medio MS libre de hormonas. a) Proliferación de múltiples tallos; b) Proceso de enraizamiento espontáneo.

Raulí explants after 21 days of culture in MS medium free of hormones. a) Multiple shoot proliferation; b) Spontaneous rooting process.

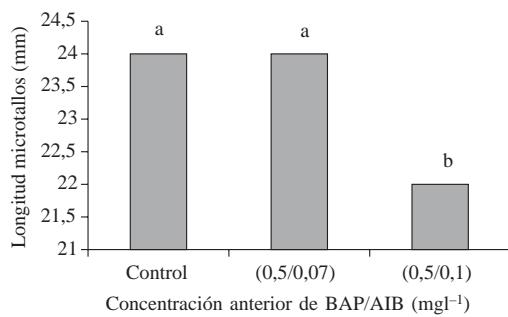


Figura 7. Longitud de microtallos provenientes de fase 2 después de 30 días en medio MS libre de hormonas (fase 3). En las barras, letras distintas indican diferencias significativas ($\alpha = 0,05$).

Length of microshoots from phase 2, after 30 days of culture in MS free hormone medium. On the bars, the different letters indicate significant differences ($\alpha = 0,05$).

CONCLUSIONES

El cultivo *in vitro* de *Nothofagus procera*, a partir de embriones maduros, requiere su germinación en medio MS libre de hormonas y los macronutrientes diluidos a 1/4; una etapa de inducción de múltiples yemas adventicias a partir de segmentos nodales en medio MS completo suplementado con 0,5 mg l⁻¹ de BAP y 0,07 mg l⁻¹ de AIB; y una etapa de elongación o proliferación de múltiples tallos en medio MS completo, libre de hormonas. Los subcultivos posteriores deben considerar un pulso de hormonas (0,5 mg l⁻¹ de BAP y 0,07 mg l⁻¹ de AIB) por no más de dos semanas, seguido de un cultivo por treinta días en medio MS completo libre de hormonas.

BIBLIOGRAFIA

- RODRIGUEZ, R., O. MATHEI, M. QUEZADA. *Flora arbórea de Chile*. Editorial de la Universidad de Concepción. 1983. 408 p.
- DONOSO, P., C. DONOSO, V. SANDOVAL. Proposición de zonas de crecimiento de renovales de Roble y Raulí en su rango de distribución natural. *Bosque* (Chile), 1993, Vol. 14, N° 2, p. 37-55.
- RODRIGUEZ, R. Arboles Chilenos para Ornamentación, el Raulí. *Chile Forestal*, 1987. 144:133.
- HARTMANN, H., D. KESTER. *Propagación de plantas: principios y prácticas*. México: Editorial continental. 1987. 760 p.
- PIERIK, R. L. M. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid: Editorial Multiprensa. 1990. 326 p.
- CALDERON, X. Influencia del calcio y ácido giberélico en alargamiento de brotes adventicios *in vitro* de *Eucalyptus globulus*. *Bosque* (Chile), 1994. Vol. 15, N° 1, p. 33-38.
- MARDONES, L. Recuperación de genotipos de avellano chileno (*Gevuina avellana* Mol.) mediante cultivo de tejidos. Memoria de Título. Fac. Cs. Forestales, Universidad de Concepción. 1999. Concepción. Chile. 40 p.
- JEREZ, J. Propagación de *Araucaria araucana* Mol. mediante cultivo *in vitro* de embriones maduros aislados. Memoria de Título. Fac. Cs. Forestales, Universidad de Concepción. 1999. Concepción. Chile. 29 p.
- MUÑOZ, M. Multiplicación *in vitro* de clones seleccionados de *Castanea sativa* Mill. Memoria de Título. Fac. Cs. Forestales, Universidad de Concepción. 1999. Concepción. Chile. 39 p.
- DINAMARCA, P. Enraizamiento *in vitro* de microtallos de *Castanea sativa* Mill. Memoria de Título. Fac. Cs. Forestales, Universidad de Concepción. 2002. Concepción. Chile. 64 p.
- SANCHEZ-OLATE, M., D. RIOS, C. LE QUESNE, M. ARANEDA, R. ESCOBAR. Capacidad morfogénica como factor de alteración de la regeneración de *Pitavia punctata* (Rev. et Pav.). En: XII Reunión de la Sociedad de Botánica de Chile y XXVII Jornadas Argentinas de Botánica. 2000. Concepción. Chile. 45 p.
- ARANEDA, M. Alternativas de recuperación de una especie en peligro mediante cultivo y multiplicación *in vitro*. El caso de *Pitavia punctata* (R. et Pav.) Mol. Memoria de Título. Fac. Cs. Forestales, Universidad de Concepción. 2000. Concepción. Chile. 29 p.
- ARAVENA, P. Micropropagación y criopreservación mediante la técnica de encapsulado de *Pinus radiata* D. Don. Memoria de Título. Fac. Cs. Silvoagropecuarias, Universidad Mayor. 2000. Temuco. Chile. 176 p.
- ZAPATA, J. Caracterización morfológica de la micropropagación en *Pinus radiata* D. Don. Tesis de Magíster en Ciencias Forestales. Universidad de Concepción. 2002. Concepción. Chile. 151 p.
- RIOS, D., M. SANCHEZ-OLATE, M. A. GEA, R. RODRIGUEZ. Nuevos sistemas experimentales para el estudio de la rizogénesis en nogal. *Agrociencia* (Chile), 2002, Vol. 17, N° 2, p. 221-228.
- MURASHIGE, T., F. SKOOG. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 1962, Vol. 15, p. 473-479.
- CALDERON-BALTIERRA, X., F. PEREZ, A. ROTELLA. Micropropagación de una especie chilena en peligro de extinción: *Gomortega keule* (Mol.) Baillón (Magnoliopsidae, Gomortegaceae). *Bosque* (Chile), 1998, Vol. 14, N° 1, p. 269-275.
- SANCHEZ-OLATE, M., D. RIOS, M. A. REVILLA, R. RODRIGUEZ. Participación de poliaminas endógenas en el desarrollo de injertos y brotes epicóricmicos de nogal. *Agrociencia* (Chile), 2002, Vol. 17, N° 2, p. 215-219.
- REY, M., A. F. TIBURCIO, C. DIAZ-SALA, R. RODRIGUEZ. Endogenous polyamine concentration in juvenile, adult and *in vitro* reinvigorated hazel. *Tree Physiology*, 1994, Vol. 14, p. 191-200.
- TAMAS, I. A. Hormonal regulation of apical dominance. In: DAVIES P. J. (ed.), *Plant hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publisher. Netherlands. 1995, p. 572-597.
- SANCHEZ-OLATE, M. Bases macromorfológicas y moleculares del cultivo *in vitro* de Nogal (*Juglans regia* L. cv. Serr.). Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. 1996. España. 203 p.