



MULTIPLICACION VEGETATIVA MEDIANTE CULTIVO *IN VITRO*

Aplicación a especies
potencialmente micorrizables
con trufa negra
(*Tuber melanosporum* Vitt.)

Por: Mauri Ablanque, P. V.*
y Marcote Zaragoza, M. M.**



Plantación de encina trufera en Navaleno (Soria)

INTRODUCCION

La producción de hongos comestibles, particularmente la trufa, que en Francia e Italia tiene una cierta tradición, se ha considerado en España como un suministro natural del monte. El precio de la trufa negra de primera categoría oscila, según el año entre 20.000 y 60.000 pta/kg. Una producción media está comprendida entre 20 y 60 kg por hectárea y año en una plantación bien conducida, llegando en años concretos a producciones de hasta 180 kg/ha/año. Podemos observar que es una alternativa de cultivo rentable en zonas donde se puede fijar la población rural y éstos, tener una importante labor de protección del medio ambiente.

La importancia de la búsqueda de alternativas viables a los cultivos tradicionales apoyadas por la Política Agraria de la Unión Europea, se ha concretado entre otras posibilidades, en el plan de reforestación y la retirada de tierras de cultivo. El hábitat natural de la trufa tiene una correspondencia con zonas rurales deprimidas, los importantes beneficios obtenidos por la venta del apreciado hongo, la posibilidad de realizar repoblaciones forestales con especies autóctonas de gran valor ecológico y el contexto de ayudas comunitarias a la repoblación de tierras agrarias, son las principales razones que hacen de la truficultura una alternativa a los

cultivos tradicionales muy a tener en cuenta en el mundo rural.

La nueva orientación de la PAC considerará que la forestación de las superficies agrarias tiene una importancia especial para el medio ambiente y el uso del suelo, siendo una alternativa productiva a las tierras rurales. En este contexto surge el Plan Nacional de Repoblación Forestal, que comprende un programa principal de repoblación de tierras agrarias aplicando el Reglamento del Consejo CEE 2080/92 del 30 de junio complementario de la reforma de la PAC. Este Reglamento Comunitario ha sido desarrollado para su aplicación en España por el Real Decreto 378/93, de 12 de marzo y se establece una ayuda para gastos de plantación en el primer año, una prima anual de mantenimiento durante los cinco primeros años y una prima anual compensatoria durante veinte años. La cuantía de estas ayudas depende del tipo de especie forestal que se plante, primando el asociacionismo de los agricultores.

En el Real Decreto 378/1993 de 12 de marzo, en el Anexo nº 2, aparecen el tilo, el quejigo y la encina como especies arbóreas cuya plantación tenga como fin principal la restauración o la creación de ecosistemas forestales permanentes.

La truficultura, al ir asociada a una forestación, puede considerarse como uno de estos métodos de producción compatibles con el medio ambiente, al contribuir a la corrección del efecto invernadero, de los graves problemas de erosión, a la mejora del suelo, la fauna, la flora y las aguas, así como a la reducción del déficit de los recursos forestales.

Con las medidas antes indicadas está

situación está empezando a cambiar. Por ello se tiene en este campo una actividad económica con dos aspectos, por una parte, la implantación de especies forestales que reciben una subvención económica, y por otra la producción de trufa negra, como producto de alto valor económico.

Primeramente se darán unas nociones básicas sobre truficultura y posteriormente se entrará en el tema de multiplicación vegetativa de las especies micorrizables con trufa negra, donde se hablará con más extensión.

TRUFICULTURA

La vida de una trufa se encuentra vinculada a la del árbol o arbusto simbiote con quien convive: la entrada en producción de la trufa depende de la especie leñosa asociada: así tenemos, unos tres años de espera con algunas jaras (*Cistus* sp.), cinco años con el avellano o la coscoja, unos ocho años con la encina o los robles. El período de producción de trufas también se dilata en función de la planta con la que micorriza, unas cuatro cosechas con las jaras, unas diez cosechas con el avellano frente a las cincuenta cosechas que pueden dar una encina antes del declive. También el sabor de las trufas varía según cual sea la planta micorrizada; siendo más apreciadas las que provienen de la encina.

La trufa negra es un hongo de aspecto globoso, áspero e irregular a modo de tubérculo negro y subterráneo, se recoge con la ayuda de perros truferos especialmente adiestrados. Entre la trufa y las raíces del árbol simbiote existe una masa de hifas y micelio que sirven de enlace entre ambos organismos.

* Ingeniero Agrónomo. Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria (I.M.I.A.). Consejería de Economía y Empleo. Comunidad de Madrid. Finca El Encin.

** Licenciada en Ciencias Biológicas.



Plantas de *Cistus salvifolius* introducidas en cultivo *in vitro*



Planta de *Cistus salvifolius* multiplicada por cultivo *in vitro*

Las trufas son hongos ectomicorrícicos (se aprecian modificaciones morfológicas en la raíz) subterráneos del género *Tuber*; que viven asociados a las raíces de ciertas plantas leñosas y arbustivas con las que establecen una simbiosis (micorrizas) de la cual se beneficia tanto el hongo como la planta leñosa o arbustiva. Solamente unas pocas especies de trufas son comestiblemente apreciadas; las de mayor valor comercial existentes en España son *Tuber nigrum* Bull (= *T. melanosporum* Vitt.), trufa negra o de Perigord que es la más afamada y apreciada en España y la *Tuber brumale* Vitt., trufa muy similar en aspecto a la trufa de Perigord pero de inferior calidad y precio que se recolecta conjuntamente con *T. melanosporum* en España.

Existen otras especies de trufas que también son comestibles que pueden comercializarse como *Tuber magnatum* Pico (trufa blanca de Italia), *Tuber aestivum* Vitt. (trufa negra de verano), *Tuber mesentericum* Vitt., *Tuber albidum* Pico, *Tuber uncinatum* Chatin.

En principio, cualquier especie de trufa puede ser cultivada, pero en lo sucesivo nos vamos a referir siempre al cultivo de *Tuber melanosporum* Vitt. por ser el más experimentado y el que ofrece unas mayores garantías de éxito así como viabilidad técnica. El cultivo de plantas leñosas micorrizadas con *Tuber melanosporum*, o truficultura, es una actividad agroforestal encaminada a

la producción de trufas. Se trata de un cultivo complejo que puede ser muy lucrativo pero que también puede conducir a fracasos después de una larga e ilusionada espera. Con los conocimientos actuales las garantías de éxito resultan bastante elevadas, pero para ello el agricultor ha de estar bien asesorado.

Para poder llevarlo a buen término son necesarios e imprescindibles:

- 1.- Un terreno favorable al cultivo de la trufa, y su adecuación.
- 2.- Elección acertada de la especie leñosa o arbustiva y disponer de plantas con un buen estado de micorrización.
- 3.- Las labores culturales oportunas (realización de una repoblación cuidadosa y las medidas culturales adecuadas)

La truficultura trata de conseguir una estabilidad en la asociación trufa negra/árbol o arbusto durante el mayor número posible de años y en las mejores condiciones; por lo que no se desea un desplazamiento del hongo. Para ello, el lugar en donde se realice la plantación ha de poseer unas características ecológicas determinadas.

Zonas truferas.

Las principales zonas truferas en España son las siguientes:

- Provincia de Álava lindando con la zona de Lóquiz (Navarra).

- las provincias andaluzas en puntos aislados.

- En Burgos y Valladolid hay zonas de trufas de verano y muy poco de trufa negra de invierno.

- Cataluña en Vic, Olot, Solsona, Berga, Prades, Vandellós, Orgañá, Vallés.

- Castellón en Morella.

- Cuenca en Tragacete y Montes Universales.

- Huesca en Graus, Benabarre y Sabiñanigo.

- Guadalajara en la zona de Molina de Aragón.

- La Rioja en la Sierra de Cameros.

- Navarra en la Sierra de Lóquiz (sobre todo en Estella).

- Soria.

- Teruel en Rubielos, Toro, Cartavieja y Sami6n.

- Valencia en Barracas.

Las zonas mencionadas son buenas productoras de trufa natural, pero esto no quiere decir que sean las únicas regiones donde se puede desarrollar la truficultura. Existen otras zonas, donde no hay presencia de trufa negra natural, cuyas condiciones edáficas serán buenas para la truficultura; pero seguro que deberíamos de influir en las labores culturales y utilizar la irrigación. La truficultura tiene una realidad actual positiva y un futuro excepcional.



Planta de *Cistus salvifolius* aclimatada



Plantas de *Cistus clusii* introducidas en cultivo in vitro

MULTIPLICACION VEGETATIVA DE ESPECIES MICORRIZABLES CON TRUFA NEGRA

Arboles y arbustos truferos.

La trufa negra (*Tuber melanosporum*) puede asociarse como simbiote con muchas especies leñosas y arbustivas en la naturaleza; pero las principales especies autóctonas con las que fructifica la trufa negra son:

- *Quercus ilex* L. = encina, carrasca o chaparra.
- *Quercus pubescens* Willd. = roble pubescente.
- *Quercus faginea* Lamk. = quejigo.
- *Quercus coccifera* L. = coscoja
- *Quercus robur* L. = roble común.
- *Quercus petraea* (Matts.) Liebl. = roble albar.
- *Corylus avellana* L. = avellano.
- *Tilia platyphyllos* Scop = tilo.
- *Cistus* sp. = jaras

Es vital disponer de la especie vegetal mejor adaptada a la zona; también es imprescindible que está tenga un buen estado de micorrización. Las plantaciones mixtas con una especie forestal y otra arbustiva también son posibles; de esta forma se consigue acelerar y dilatar la producción trufera; a cambio la técnica de cultivo resulta más compleja. La planta a elegir debe ser adecuada. Una posibilidad importante es la de obtener beneficios diversificados.

En estos momentos se produce planta micorrizada, básicamente procedente de semilla. Para mejorar las condiciones de asociación micorríca se deben de mejorar y estudiar las condiciones genéticas de los simbiontes; para ello una forma de lograrla

es la de la propagación vegetativa llevada a cabo en avellano y que estamos intentando realizar en otras especies.

En las plantas leñosas obtenidas por vía sexual existe una gran variabilidad debido a su gran heterocigosis. La variabilidad observada en las producciones truferas es muy alta y por ello existe gran posibilidad de una gran mejora genética en la utilización de la propagación vegetativa.

La encina se escoge como especie por excelencia de las producciones truferas y tienen gastronómicamente un valor añadido frente a la de otras especies. La especie más apreciada para la micorrización es la encina que es un árbol rústico que se adapta bien a las condiciones de secano, y a los altos niveles de pH de las zonas truferas. Su crecimiento es lento y entra en producción a partir del octavo año de su plantación en el campo.

Multiplicación vegetativa de árboles y arbustos truferos.

En el proyecto denominado "Desarrollo de bases para la mejora de la truficultura" que ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias y Alimentarias (INIA) se han estudiado las distintas formas de multiplicación vegetativa, de estas tres especies *Tilia platyphyllos* Scop., *Quercus faginea* Lamk. y *Quercus ilex* L., además de varias especies de jaras (*Cistus salvifolius* L., *C. albidus* L., *C. laurifolius* L. y *C. clusii* Dunal DC.).

La indiscutible importancia ecológica de la dehesa no debe dejar de lado a su importancia económica, sobre todo en aquellas constituidas con especies del género *Quercus*. Pero esta rentabilidad económica se ve fuertemente disminuida por la total ausencia

de mejora genética. Como producción directa estos magníficos árboles nos proporcionan bellotas y la posibilidad de obtención de setas de alto valor comercial como la trufa. En estos caracteres: producción de bellota y calidad de la misma y capacidad de micorrización con trufa, se observa una enorme variabilidad genética que nunca ha sido aprovechada por el hombre.

La mejora genética en el género *Quercus* se encuentra con una serie de problemas que dificultan enormemente la puesta en marcha de programas de mejora clásica mediante selección y cruzamientos, como son la duración del ciclo de vida o la falta de unos parámetros de selección detectables en fases juveniles. Por otro lado la dificultad para multiplicarlos vegetativamente impide la utilización de clones (material de la misma composición genética) procedentes de árboles seleccionados.

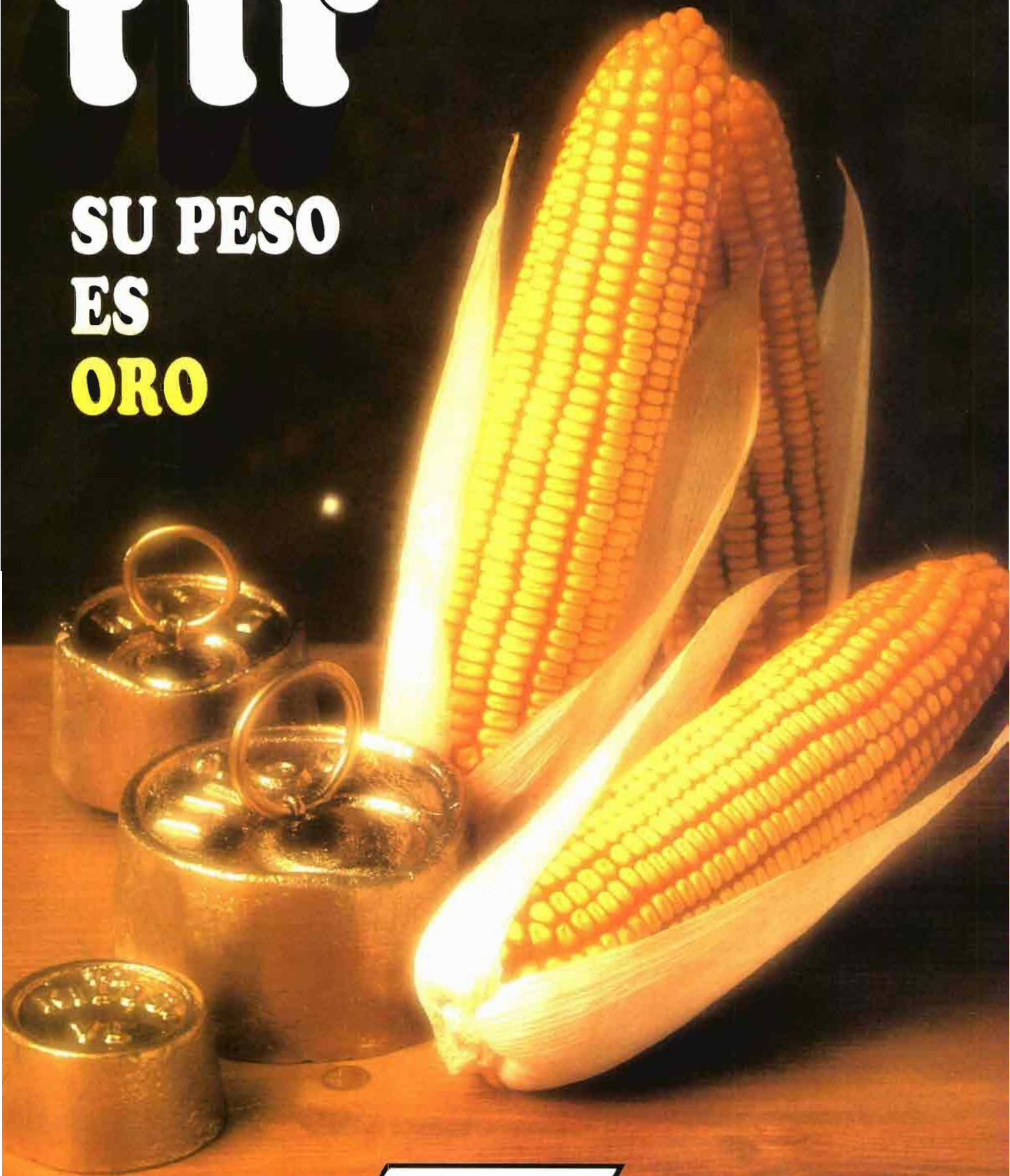
Tanto la utilización de mezclas de individuos clonados a partir de árboles seleccionados "plus" como la multiplicación vegetativa de la descendencia procedente de cruzamientos controlados, son técnicas ampliamente utilizadas en la mejora genética forestal y que permiten, en muy poco tiempo, una importante ganancia genética. Poner a punto un sistema de multiplicación vegetativa resultaría entonces abrir una puerta al aumento de rentabilidad de uno de nuestros sistemas de producción agraria más extendido y de mayor valor ecológico.

Hemos trabajado en **estaquillado** de planta adulta de tilo, encina y quejigo; donde no se ha conseguido enraizamiento de plantas en la encina y el quejigo y si se ha conseguido en un porcentaje del 2 % en el tilo de zonas bajas del árbol (que teóricamente tiene un estado más juvenil).

Donde se está incidiendo más es en las

fir

**SU PESO
ES
ORO**



semillas
CARGILL



técnicas de cultivo *in vitro* tanto por la vía de organogénesis (multiplicación de yemas axilares) como a través de embriogénesis somática. La embriogénesis somática es una de las vías para la regeneración de plantas a partir del cultivo de tejidos vegetales; está consiste en la obtención de embriones a partir de diferentes partes de la planta (los embriones somáticos son similares a los que se obtienen en las semillas por origen sexual).

Dentro de las especies trufíferas más productivas se encuentran el *Quercus faginea* Lamk. y el *Quercus ilex* L. La multiplicación vegetativa de estas especies es muy problemática de la forma tradicional, como hemos comprobado con los ensayos de estaquillado en Septiembre y en Abril. La posibilidad de **micropropagación** puede ser una alternativa viable. Hasta ahora los intentos de introducción tanto de planta joven como adulta, chocaban con proble-

mas como una importante vía de micropropagación para apoyo en programas de mejora.

En el Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria de la Comunidad de Madrid se están llevando a cabo trabajos de investigación sobre embriogénesis somática en quercíneas.

El *Quercus ilex* L. y el *Quercus faginea* Lamk. nos proporcionan la posibilidad de obtención de setas de alto valor comercial como la trufa; en la capacidad de micorrización de *Tuber melanosporum* Vitt., se observa una enorme variabilidad genética que nunca ha sido aprovechada por el hombre.

Nosotros hemos ensayado a propagar estas especies a través de embriogénesis somática. Para inducir embriogénesis somática en bellotas de encina y quejigo hemos esterilizado la superficie con hipoclorito sódico y los embriones cigóticos con los sacos embrionarios los hemos sacado y los hemos cultivado en diferentes medios de

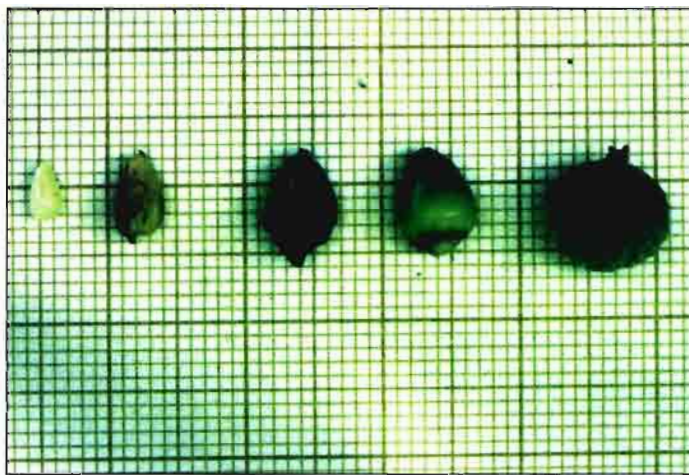
partir de embriones cigóticos. Se ha obtenido germinación de embriones en encina, realizándose en la actualidad estudios encaminados a la optimización de las distintas fases del proceso embriogénico y de conversión en plantas.

Los embriones cigóticos, particularmente inmaduros de encina y quejigo, han permitido el desarrollo de cultivos embriogénicos en muchas plantas recalcitrantes. Rápidamente dividen, las células embrionarias indiferenciadas crecen fácilmente en cultivo y generan embriones adventicios. También es importante el estado de desarrollo de los explantos para la producción de embriones adventicios (GINGAS y LINEBERGER, 1.989).

Se muestra una influencia de la época de recolección sobre la inducción de embriogénesis somática (relacionada con el estado de desarrollo del embrión cigótico), posiblemente más importante que la acción de los



Camas de estaquillado en invernadero



Secuencia de excisión de la bellota de encina para la introducción en cultivo *in vitro*

mas graves de oscurecimiento del medio por oxidación de exudaciones fenólicas. Trabajos previos revelan la posibilidad de multiplicación de árboles juveniles de quercíneas; sin embargo, no han tenido éxito con los árboles adultos (CHALUPA, 1990).

En la introducción en cultivo *in vitro* de especies quercíneas hemos constatado que aparecen oxidaciones de fenoles (browning, que aparece al introducir el material en el cultivo *in vitro* y que termina necrosándolo) siempre que hemos utilizado medios de cultivo como el Murashige & Skoog; Sommer; Woody Plant Medium; Schenk & Hildebrandt; por ello se están desarrollando otros métodos de introducción para evitar la aparición de browning. Mediante la utilización de medio blanco (agar + agua) o directamente en vermiculita estéril, se consigue que las semillas germinen sin dar problemas de oxidaciones en el medio, como paso previo a su posterior micropropagación en medios de cultivo estándares.

La **embriogénesis somática** se presen-

cultivo. La embriogénesis somática ha sido conseguida en varias especies del género *Quercus* y con diferentes explantos iniciales; *Quercus ilex* L. (FÉRAUD-KELLER y ESPAGNAC, 1989) (MAURI y TORIBIO, 1.995) (MAURI *et al.*, 1.996), *Quercus acutissima* (KIM *et al.*, 1.994), *Quercus bicolor* (GINGAS, 1991), *Quercus suber* L. (EL MAËTAOUI y ESPAGNAC, 1.987) (BUENO *et al.*, 1.992), *Quercus robur* (CHALUPA, 1.990), *Quercus rubra* L. (GINGAS y LINEBERGER, 1.989), *Quercus faginea* Lamk. (FERNÁNDEZ-GALIANO *et al.*, 1.996) y *Quercus alba* (GINGAS y LINEBERGER, 1.989). En algunas especies la germinación de los embriones somáticos ha sido observada.

Es en este punto, la multiplicación vegetativa del género *Quercus*, en el que nuestro grupo de trabajo, en el marco del Programa Nacional Sectorial de Investigación Agraria, ha centrado su esfuerzo, consiguiendo poner a punto una técnica de obtención de embriones somáticos en encina y quejigo a

reguladores del crecimiento. Los embriones cigóticos recolectados en agosto son más susceptibles a la inducción de embriogénesis somática. Ver la tabla nº 1 años 1.993 y 1.995 como ejemplo de producción de embriones somáticos en la encina.

La alta capacidad proliferativa de los cultivos sugiere el futuro prometedor de la técnica de embriogénesis somática como sistema de multiplicación vegetativa de la especie y con ello utilizar a las plantas obtenidas como fuente de planta para micorrizar con *Tuber melanosporum* Vitt. Hemos conseguido plantas a partir de embriones somáticos de encina las cuales no hemos llegado a aclimatar.

En las **jaras** la precocidad en la producción trufífera hace viable un cultivo rentable y sobre todo en cultivo mixto con las especies arbóreas por lo que hemos introducido en cultivo *in vitro* cuatro especies *Cistus salvifolius* L., *C. albidus* L., *C. laurifolius* L. y *C. clusii* Dunal DC.; las cuales comentamos a continuación.

De las especies citadas se ha conseguido introducir en cultivo todas ellas *Cistus salvifolius* L., *C. albidus* L., *C. laurifolius* L. y *C. clusii* Dunal DC. a partir de semillas y posterior reproducción por micropropagación obteniendo clones de las dos primeras especies de *Cistus*. Las otras dos especies están actualmente en fase de clonación.

En *C. salvifolius* L. se ha conseguido aclimatar en contenedor plantas de clones obtenidos *in vitro*.

La alta capacidad proliferativa de los cultivos sugiere un futuro prometedor de la técnica de micropropagación como sistema de multiplicación vegetativa y una herramienta



Embriones somáticos de encina con raíces.

MEDIO	FECHA	EMB.	NR	% NR	SE	% SE	BRO	% BRO	CONT.	%CON
2	20/07/93	80	19	23.75	0	0	39	48.75	22	27.50
2	9/08/93	80	14	17.50	2	2.5	31	38.75	33	41.25
2	1/09/93	80	5	6.25	0	0	35	43.75	40	50.00
1	1/08/95	12	3	25.00	4	33.333	5	41.67	0	0.00
2	1/08/95	10	3	30.00	4	40	2	20.00	1	10.00
3	1/08/95	12	9	75.00	0	0	3	25.00	0	0.00
4	1/08/95	10	5	50.00	2	20	3	30.00	0	0.00
5	1/08/95	10	3	30.00	3	30	3	30.00	1	10.00

para la consecución de plantas micorrizadas.

Cistus salvifolius L.

Se ha conseguido una germinación del 54 % de las semillas con una inmersión durante 5 minutos en agua a 100°C y posterior esterilización con lejía (hipoclorito sódico) y mediante repicados sucesivos se han conseguido micropropagar 30 clones diferentes; de los que en 5 hemos realizado un ensayo de elongación y enraizamiento, con un tratamiento de una semana de oscuridad y tres semanas de luz o cuatro semanas de luz, se han utilizado 25 explantos de 1 cm. por tratamiento y clon y en los 25 restantes se han conservado en cámara frigorífica a 41C.

En el tratamiento de 1 semana de oscuridad el clon 1 es el que más ha crecido **4,70 cm.**(el rango de crecimiento en los 2 tratamientos y en los 5 clones es de **3,45 - 4,70 cm.**).

El enraizamiento más alto es del **88,88 %** en el clon 5 en el tratamiento de 4 semanas de luz (el rango de enraizamiento en los 2 tratamientos y en los 5 clones es de **42,86 - 88,88 %**). Todas las plantas enraizadas tienen raíces laterales.

Posteriormente todas las plantas de más de 3 cm. y enraizadas se aclimataron.

C. albidus L.

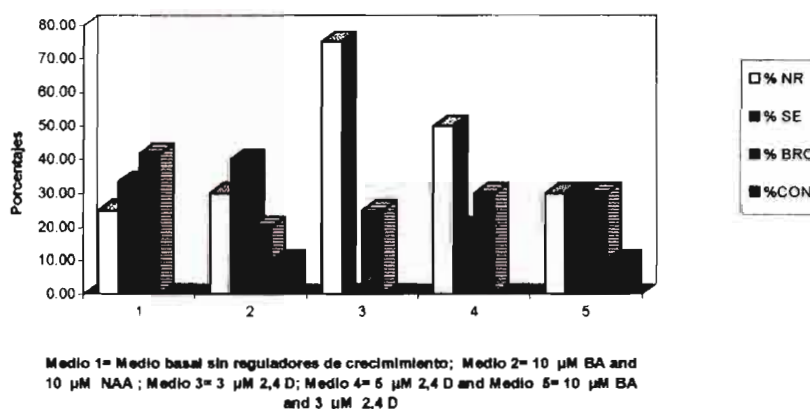
Se ha conseguido una germinación del 52 % con el mismo tratamiento de la jara anterior y mediante repicados sucesivos se han conseguido micropropagar 25 clones diferentes; de los que hemos realizado un ensayo de elongación y enraizamiento, con un tratamiento de una semana de oscuridad y tres semanas de luz o cuatro semanas de luz y dos concentraciones de BAP (1 y 0,1 :M) , se han utilizado entre 40 a 97 explantos de 1 cm. en los tratamientos.

En el tratamiento de 1 semana de oscuridad los explantos crecen más hasta **2,64 cm.** en el tratamiento de 1:M de BAP (el rango de crecimiento en el tratamiento de 1 semana de oscuridad es de **2,01 - 2,64 cm.**); en el tratamiento de luz durante 1 mes

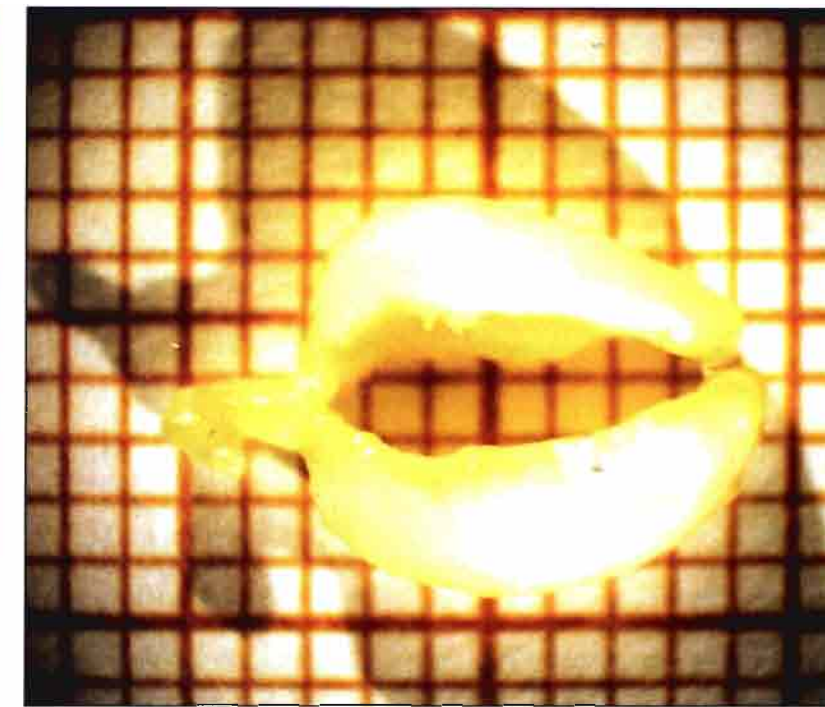
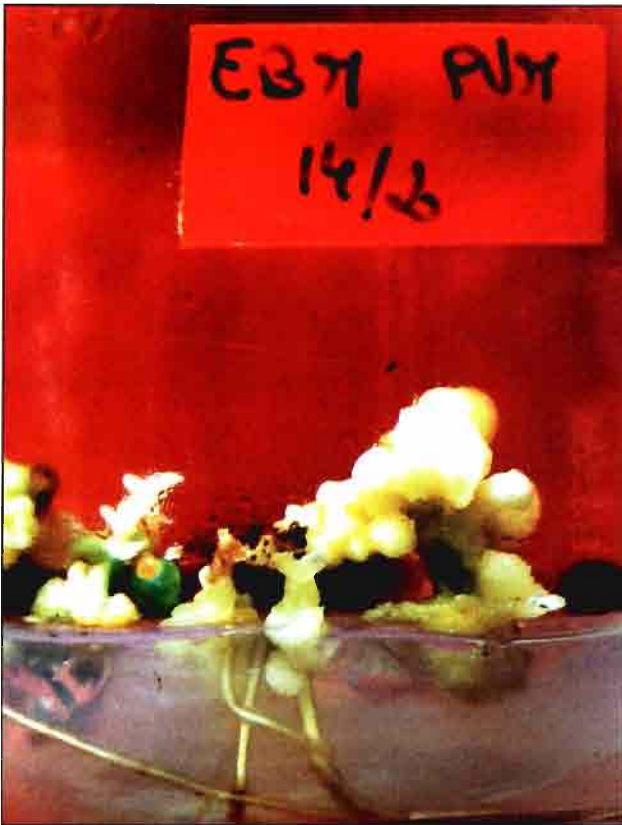
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EMBRIONES CIGÓTICOS DE *Quercus ilex* L. AÑO 1.993.



EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Quercus ilex* L. AÑO 1995.



Medio 1= Medio basal sin reguladores de crecimiento; Medio 2= 10 µM BA and 10 µM NAA ; Medio 3= 3 µM 2,4 D; Medio 4= 5 µM 2,4 D and Medio 5= 10 µM BA and 3 µM 2,4 D



Embriones somáticos de encina con raíces

Embrión somático de encina con embriogénesis recurrente en el hipocotilo

el rango de variación es de 1,6 - 2,03 cm.

El enraizamiento más alto es del 50 % en el tratamiento de 1 semana de oscuridad y con la concentración de 0,1 :M de BAP el rango de enraizamiento es de 17,53 - 50,00 %).

C. laurifolius L.

Se ha conseguido una germinación del 45 % y mediante repicados sucesivos se están consiguiendo micropropagar clones diferentes; de los que hemos realizado un ensayo de elongación y enraizamiento.

Los explantos crecen en el medio basal una media de 1,62 cm. ; el enraizamiento es del 72,15 % y no existen raíces laterales; la longitud media de la raíz es de 2,17 cm..

C. clusii Dunal DC.

Se ha conseguido una germinación del 55% y mediante repicados sucesivos se están consiguiendo micropropagar clones diferentes; de los que hemos realizado un ensayo de elongación y enraizamiento.

Los explantos crecen en el medio basal una media de 2,32 cm. ; el enraizamiento es del 81,48 % y el porcentaje de proliferación es del 61,11 %; la longitud media de la raíz es de 2,32 cm..

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

-BUENO M. A., ASTORGA R. and MANZANERA J. A. (1992) Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Quercus suber*. *Physiologia Plantarum* 85, 30-34.

-CHALUPA V. (1990) Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.). *Plant Cell Reports* 9, 398-401.

-EL MAËTAOUI M. and ESPAGNAC H. (1987) Néofornation de structures de type embryons somatiques sur des cultures de tissu de chêne liège (*Quercus suber* L.) Neofornation of somatic embryos-like structures from cork-oak (*Quercus suber* L.) tissue cultures. *C. R. Acad. Sci. Paris* 304, 83-88.

-FÉRAUD-KELLER C. and ESPAGNAC H. (1989) Conditions d'apparition d'une embryogénese somatique sur des cals issus de la culture de tissus foliaires du chêne vert (*Quercus ilex*). *Can. J. Bot.* 67, 1066-1070.

-FERNÁNDEZ-GALIANO E., MAURI P.V. and GARCÍA G. (1996) Somatic embryogenesis induction on *Quercus faginea* LAMK. *Program and book of abstracts of Third International Symposium on in vitro Culture and Horticultural Breeding*, 18.

-FERNÁNDEZ-GUIJARRO B., CELESTINO C. and 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.

-GAMBORG O.L. (1966) Aromatic metabolism in plants. II. Enzymes of the shikimate path-

way in suspension cultures of plant cells. *Can. J. Biochem.* 44:791-799.

-GINGAS V. M. and LINEBERGER R. D. (1989) Asexual embryogenesis and plant regeneration in *Quercus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 17, 191-203.

-GINGAS V. M. (1991) Asexual embryogenesis and plant regeneration from male catkins of *Quercus*. *HortScience* 26, 1217-1218

-KIM Y. W., LEE B. C., LEE S. K. and JANG S. S. (1994) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Quercus acutissima*. *Plant Cell Reports* 13, 315-318.

-MARTINEZ DE AZAGRA, A. y GRIGELMO, C. Implantación de trufas. Hojas divulgadoras Núm 12/91 HD del MAPA.

-MAURI P.V. and TORIBIO M. (1995) Inducción de embriogénesis somática en embriones cigóticos de *Quercus ilex* L. *Resumos de IV Congresso Luso-Espanhol de Fisiologia Vegetal*, 209.

-MAURI P.V., GARCÍA G. and FERNÁNDEZ-GALIANO E. (1996) Somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of *Quercus ilex* L. *Program and book of abstracts of Third International Symposium on in vitro Culture and Horticultural Breeding*, 39.

-MURASHIGE T. and SKOOG F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

SCHENK R.U. and HILDEBRANT A.C. (1.972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199-204.