2025 GIJÓN | 16·20 JUNIO

9º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

9CFE-1558

Actas del Noveno Congreso Forestal Español
Edita: **Sociedad Española de Ciencias Forestales. 2025**.
ISBN: **978-84-941695-7-1**

Organiza

Optimización de la crioconsevación en cultivos embriogénicos de *Pinus pinaster*.mediante enfriamiento controlado

GONZÁLEZ SIMÓN, L. (1), CUENCA VALERA, B. (1), HERMIDA DIÉGUEZ, D. (1) y GONZÁLEZ BENITO, M.E. (2)

(1) Vivero de Maceda. Empresa de Trasformación Agraria (TRAGSA).

(2) Departamento de Biotecnología – Biología Vegetal. Universidad Politécnica de Madrid.

Resumen

Los cultivos embriogénicos son fundamentales para la conservación genética y la mejora de *Pinus pinaster*, especie esencial en la silvicultura mediterránea. La crioconservación ofrece una solución eficiente para la preservación a largo plazo, minimizando riesgos como la contaminación, la pérdida de capacidad embriogénica y los cambios genéticos derivados del subcultivo frecuente. En este estudio, se evaluaron cinco genotipos seleccionados por su capacidad proliferativa, analizando el impacto de los crioprotectores y diferentes tasas de enfriamiento.

La técnica de crioconservación empleada, enfriamiento a velocidad controlada, está diseñada para ultracongeladores de -80 °C. Sin embargo, fue adaptada a un congelador disponible de -150 °C mediante el diseño de una caja aislante, que permitió regular la transferencia térmica y alcanzar una velocidad de enfriamiento próxima a -1 °C/min, equiparable a la obtenida con los equipos estándar. Este ajuste permitió una recuperación celular eficaz y garantizó la viabilidad del material genético.

Tras optimizar el protocolo, se obtuvo una viabilidad celular del 60 % en los genotipos más prometedores, con respecto al control. Este procedimiento representa un avance significativo en la conservación de *P. pinaster* y resulta potencialmente aplicable a otras coníferas, contribuyendo a la resiliencia de los ecosistemas forestales frente a amenazas climáticas y patógenas.

Palabras clave

Viabilidad celular, mejora genética, tetrazolio, crioprotectores, conservación diversidad genética.

1. Introducción

Pinus pinaster Ait. se distribuye principalmente en la región mediterránea de Europa, extendiéndose su presencia a otras áreas de Europa occidental (TAPIAS et al., 2004). Destaca por su resistencia a condiciones adversas (RIBEIRO et al., 2023), siendo importante para la protección de zonas montañosas mediante la estabilización del suelo. Encabeza, como especie, la producción de resina, con aplicaciones medicinales significativas (URIARTE, 1995). Según el ANUARIO DE ESTADÍSTICA FORESTAL (Ministerio para la Transición Ecológica y Reto Demográfico, 2021), *P. pinaster* representa el 14% del volumen total de madera en los bosques de España y ocupa un 36% de la superficie repoblada. Es

especialmente notable en Galicia, donde su contribución a la corta nacional alcanza el 58,34%.

La conservación y gestión adecuadas de sus poblaciones son vitales para salvaguardar su diversidad genética y su capacidad de adaptación frente a amenazas como la deforestación, incendios y el cambio climático (SÁNCHEZ-SALGUERO et al., 2012; VIZCAÍNO-PALOMAR et al., 2014). En España, la sobreexplotación y la degradación de hábitats han disminuido sus poblaciones (PRIETO-RECIO et al., 2015), y enfermedades como la producida por el nemátodo *Bursaphelenchus xylophilus* representan una amenaza significativa (KIM et al., 2020).

La mejora genética es una estrategia prometedora para aumentar la resiliencia y la salud de *P. pinaster*, desarrollando genotipos con mejor crecimiento, adaptabilidad y resistencia a enfermedades (SANTOS DEL BLANCO et al., 2013; ZAS y MERLO, 2008). *P. pinaster* es esencial en Galicia por su valor productivo y se utiliza principalmente para trituración debido a la baja calidad de su madera (MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ, 2017). En respuesta a la alta demanda de semilla de calidad, se lanzó un programa de mejora genética que continúa actualmente. Este programa incluyó la selección de árboles superiores y la creación de huertos semilleros registrados en el Catálogo Nacional de Materiales de Base. A partir de estos programas de mejora genética se estableció el huerto de A Braxe (A Coruña), consolidando una población élite resistente a *Fusarium circinatum* y tolerante a *Bursaphelenchus xylophilus* (ZAS y MERLO, 2008; MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ, 2017).

La aplicación de técnicas como la selección clonal, el cultivo *in vitro* y la genómica han demostrado ser efectivas para mejorar la productividad y la calidad de la madera de *P. pinaster* (BARTHOLOMÉ et al., 2016; PLOMION et al., 2016). Estos métodos permiten propagar e identificar individuos con rasgos genéticos deseables, acelerando el proceso de mejora de las poblaciones forestales. Además, las técnicas de cultivos embriogénicos son cruciales para la mejora genética de *Pinus spp*. permitiendo la conservación *in vitro* de genotipos raros, únicos o amenazados (BERCETCHE & PAQUES, 1995) y reduciendo el tiempo necesario para desarrollar nuevas variedades mejoradas (GAO et al., 2020; RAMÍREZ-MOSQUEDA, 2022).

Existen protocolos optimizados para cultivos embriogénicos de *P. pinaster* como el propuesto por ARRILLAGA *et al.* (2019), que mejoran la producción de embriones somáticos. Sin embargo, las células embriogénicas tienden a perder su capacidad de embriogénesis después de seis meses (CANO *et al.*, 2018), lo que subraya la necesidad de implementar técnicas avanzadas para la conservación de este germoplasma. La crioconservación surge como una herramienta clave para mantener la viabilidad de estos genotipos de una forma temprana y a largo plazo, utilizando temperaturas extremadamente bajas (-150 ^{0}C o inferiores) para preservar el material vegetal. La crioconservación se basa en técnicas de deshidratación por congelación o vitrificación de solutos internos (ENGELMANN, 2004; REED, 2008). Los principales protocolos usados en la crioconservación son el enfriamiento a velocidad controlada, la vitrificación en sentido estricto y la

encapsulación-desecación.

El protocolo de enfriamiento a velocidad controlada previene la formación de cristales de hielo intracelulares que dañan las células. Enfriar las células de forma gradual (normalmente 1 ºC/minuto) provoca que se formen cristales de hielo en las soluciones extracelulares, haciendo que el agua intracelular salga estableciendo un equilibrio osmótico que reduce el riesgo de formación de hielo en el interior. Se usan crioprotectores como el polietilenglicol (PEG) y dimetilsulfóxido (DMSO) para disminuir el punto de congelación y estabilizar las membranas celulares, previniendo la nucleación de cristales de hielo, letales para las células (REED, 2008). Al alcanzar aproximadamente -40 ºC, se lleva a cabo un enfriamiento rápido (generalmente por inmersión en nitrógeno líquido, NL), y las soluciones intracelulares vitrifican. El estado vítreo es un sólido amorfo que no provoca daños celulares. Esto evita los daños mecánicos asociados a la expansión del hielo y asegura una mayor viabilidad (BENSON, 2008).

La vitrificación en sentido estricto es una técnica que utiliza soluciones muy concentradas de crioprotectores como glicerol, etilenglicol y DMSO para deshidratar las células y aumentar la viscosidad del citoplasma; al enfriar rápidamente las células (por inmersión en NL), tanto las soluciones intra- como extracelulares vitrifican. Esta técnica minimiza el daño celular asociado con la congelación asegurando una mayor viabilidad (ENGELMANN, 2011; SAKAI et al., 2008).

La encapsulación-desecación consiste en encapsular el material vegetal en una matriz de alginato de calcio, seguido de una desecación controlada para reducir el contenido de agua y prevenir la formación de cristales de hielo. Las cuentas de alginato se desecan en una cabina de flujo laminar o con gel de sílice, y se sumergen rápidamente en NL, consiguiendo así la vitrificación de las soluciones intra- y extracelulares. La deshidratación minimiza el riesgo de formación de hielo, y la matriz de alginato protege la integridad celular durante el proceso de enfriamiento (ENGELMANN, 2011; SAKAI et al., 2008).

La elección de cada técnica depende de factores como el personal, los equipos, la experiencia, el tipo de material vegetal y los recursos disponibles en la instalación. La transferencia entre diferentes laboratorios puede presentar complicaciones; sin embargo, con la atención adecuada a cada uno de los pasos, la mayoría de las técnicas pueden ser implementada exitosamente (REED, 2008). En este estudio se ajustó el protocolo descrito por CANO *et al.* (2018), basado en el enfriamiento controlado, a nuestras instalaciones para optimizar el desarrollo de la técnica con el equipamiento y las capacidades técnicas disponibles.

Estudios recientes han explorado la aplicabilidad de la crioconservación en diversas especies de *Pinus*, destacando su potencial para preservar la diversidad genética y facilitar el intercambio de material (GAO et al., 2020; AYALA et al., 2023). En *P. pinaster* se han desarrollado diversos protocolos de crioconservación de tejidos embriogénicos, con variaciones en parámetros de crioconservación como el

precultivo, la solución crioprotectora y la temperatura de preenfriamiento, entre otros. Una revisión de dichos estudios se encuentra en la Tabla 1.1 y la Tabla 1.2. La mayoría de estos trabajos utilizaron el dispositivo Mr. Frosty, con el que se consigue una velocidad de enfriamiento de 1°C/min.

Entre estas investigaciones destaca la de ÁLVAREZ *et al.* (2012), en la cual se evaluaron diferentes protocolos de crioconservación, variando la solución crioprotectora y la temperatura de pre-enfriamiento. Además, los autores examinaron el efecto de la crioconservación en la capacidad de maduración de los embriones somáticos y su conversión en plantas. Los resultados demostraron una alta eficacia de crioconservación, con una solución polietilenglicol-sacarosa-DMSO y una temperatura de pre-enfriamiento óptima de -40 ºC, con un protocolo de crioconservación que asegura una alta tasa de recuperación y de maduración de embriones.

Tabla 1.1 Revisión bibliográfica sobre crioconservación para callos de células embriogénicas de Pinus spp.

Especie	Explanto	Método	Velocidad enfriamiento	Referencia
P. radiata	Tejidos embriogénicos	Enfriamiento a velocidad controlada	1 ºC /min Mr Frosty	HARGREAVES *et al.* (2002)
Picea glauca *Pseudotsuga menziesii*	Embriones somáticos inmaduros	Vitrificación directa	Directamente a NL	KONG & VON ADERKAS (2011)
P. nigra	Tejidos embriogénicos	Enfriamiento a velocidad controlada	Mr Frosty con sonda hasta -40ºC y NL 1hora	SALAJ *et al.* (2011)
P. pinaster	Tejidos embriogénicos	Enfriamiento a velocidad controlada	Mr Frosty preenfriado a 4ºC	ÁLVAREZ *et al.* (2012)
P. nigra	Tejidos embriogénicos	Enfriamiento a velocidad controlada	Mr Frosty con sonda hasta llegar a -40ºC	SALAJ *et al.* (2012)
P. sylvestris	Tejidos embriogénicos	Enfriamiento a velocidad controlada	1 ºC/min hasta -39 ºC en un congelador programable	LATUTRIE & ARONEN (2013)
P. pinea	Tejidos embriogénicos	Enfriamiento a velocidad controlada	Mr Frosty preenfriado a 0ºC	CARNEROS *et al.* (2017)
P. radiata	Tejidos embriogénicos	Enfriamiento a velocidad controlada	Mr Frosty a -80ºC 120min.	LINEROS *et al.* (2018)
P. pinaster	Tejidos embriogénicos	Enfriamiento a velocidad controlada	Mr Frosty 24h a -80ºC	CANO *et al.* (2018)

P. pinaster	Tejidos embriogénicos	Enfriamiento a velocidad controlada	Mr Frosty 24h a -80ºC	MENDOZA-POUDEREUX et al. (2022)

Tabla 1.2 Revisión bibliográfica sobre crioconservación para callos de células embriogénicas de Pinus spp. (Continuación)

Especie	Precultivo	Crioprotector	Recuperación	Referencia
P. radiata	10 días en medio con sorbitol 0,4M	10% DMSO en medio con sorbitol 0,4 M	Con tejido nodriza	HARGREAVES *et al.* (2002)
Picea glauca *Pseudotsuga menziesii*	4-8 semanas a 5 ºC en medio ABA		Calentamiento baño de agua	KONG & VON ADERKAS (2011)
P. nigra	24 horas en medio con sacarosa, maltosa y sorbitol (cada uno 0,5 M)	DMSO 7,5%	Calentamiento baño de agua	SALAJ *et al.* (2011)
P. pinaster	24 horas en medio con maltosa 2M y luego añadir maltosa 2M	20 g/L PEG 4000, 20 g/L sacarosa, 20% DMSO)	Calentamiento baño de agua	ÁLVAREZ *et al.* (2012)
P. nigra	8 días en medio con 2% de sacarosa	DMSO 15%	Calentamiento baño de agua	SALAJ *et al.* (2012)
P. sylvestris	24 horas en medio con sacarosa 0,2 M y posteriormente 24 horas con sacarosa 0,4 M	10% PEG 6000, 10% glucosa, 10% DMSO	Calentamiento baño de agua Lavado con medio líquido. Rehidratación concentraciones decrecientes de sacarosa	LATUTRIE & ARONEN (2013)
P. pinea	---------	16,7% PEG 4000, 16,7% glucosa, 16,7% DMSO	Calentamiento baño de agua Lavado con medio liquido Rehidratación concentraciones decrecientes de sacarosa	CARNEROS et *al.* (2017)
P. radiata	48 horas en medio con sorbitol 0,4M	DMSO 10% v/v + l-prolina 0,09 M	Calentamiento baño de agua Lavado con medio liquido	LINEROS *et al.* (2018)
P. pinaster	Medio con maltosa 0,2M, luego 24 horas, maltosa 0,4M	10% sacarosa, 10%PGE-4000, 10% DMSO	Calentamiento baño de agua Lavado con medio liquido	CANO *et al.* (2018)

P. pinaster	Medio con maltosa 0,2M, luego 24 horas, maltosa 0,4M	10% sacarosa, 10%PGE-4000, 10% DMSO	Calentamiento baño de agua Lavado con medio liquido	MENDOZA-POUDEREUX et al. (2022)

2. Objetivos

Objetivo general.

Desarrollar y optimizar un protocolo de crioconservación para cultivos embriogénicos de *Pinus pinaster*, obtenidos de progenitores seleccionados por su calidad de madera y tolerancia a enfermedades y plagas, teniendo en cuenta las limitaciones técnicas impuestas por la infraestructura disponible del laboratorio para garantizar la viabilidad celular y la estabilidad genética a largo plazo.

Objetivos específicos.

Adaptar el protocolo de enfriamiento controlado a las condiciones de laboratorio, que carece de un ultracongelador a -80 ^{0}C, equipo habitualmente utilizado en este tipo de técnica de crioconservación. Como alternativa , se empleará un ultracongelador a -150^{0}C, diseñando estrategias que permitan controlar la velocidad de enfriamiento y replicar un descenso térmico próximo a -1^{0}C/min.

Llevar a cabo ensayos iniciales para la puesta a punto del protocolo, incluyendo pruebas de viabilidad celular mediante 2,3,5 – trifenil-tetrazolio, el análisis del efecto de soluciones crioprotectoras y el control de parámetros básicos en cultivos testigo no crioconservados.

Optimizar distintos parámetros del protocolo inicial para identificar combinaciones óptimas que permitan una alta viabilidad celular y la conserven de la integridad genética en los cultivos embriogénicos.

3. Metodología Material vegetal

El material vegetal empleado consistió en conos recolectados del huerto semillero de A Braxe (A Coruña). A partir de las semillas, se obtuvo el callo embriogénico (CE) (Figura 1) siguiendo el protocolo descrito por CANO *et al.* (2018) . El CE se subcultivó quincenalmente en medio Litvay modificado (CANO *et al.*, 2018), seleccionando aquellas zonas con crecimiento activo, caracterizadas por presentar estructuras de aspecto ocre con suspensores (Figura 2).

Los árboles proceden del programa gallego de mejora de *P. pinaster* que seleccionó individuos por sus buenas características madereras, así como por su resistencia o tolerancia a diversas enfermedades y plagas.

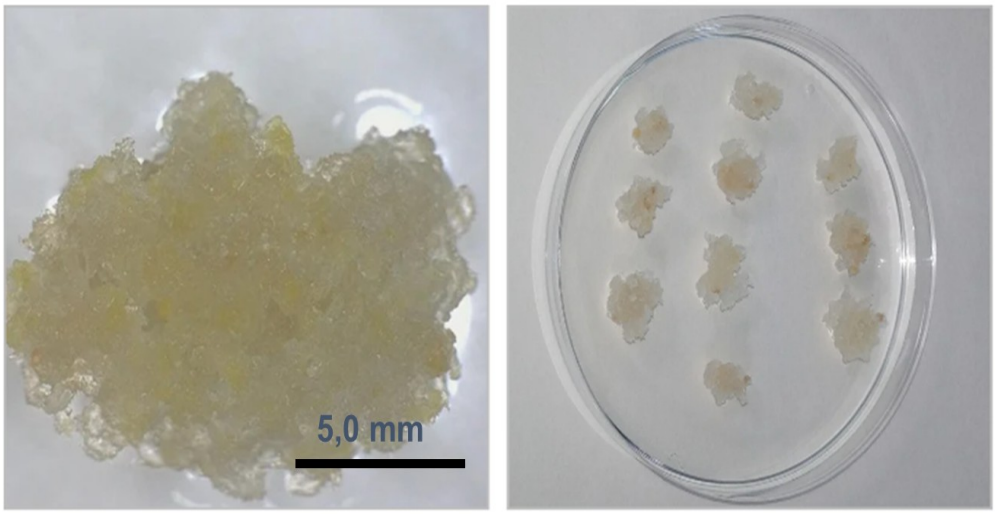

Figura 1. Callo embriogénico de Pinus pinaster.

Figura 2. Masas preembriogénicas con suspensores y la zona ocre. Para la selección de estas estructuras se requiere el uso de una lupa.

Puesta a punto del test de tetrazolio

Antes de iniciar el estudio de crioconservación, se optimizó un test de viabilidad con 2,3,5 – trifenil-tetrazolio (TTC) para poder obtener resultados rápidos de evaluación de supervivencia (HEINE-DOBBERNACK et al, 2008). Se pesaron tres réplicas de 50 mg de CE de tres genotipos diferentes, añadiendo 300 µl de solución TTC 2% (p/v) preparado en tampón fosfato 0.05M, pH 7,5, y 1200 µl adicionales del mismo tampón. Las muestras se incubaron a 28 ºC en oscuridad durante 6 y 18 horas. Tras la incubación, se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos, retirando con cuidado el sobrenadante. Se añadió etanol absoluto (1700 µl) para extraer la coloración, dejando los tubos en oscuridad y a temperatura ambiente *overnight* (O/N). Se incluyeron controles negativos de células muertas, tratadas a 80 ºC durante 1 hora.

Selección de genotipos

Se seleccionaron cinco genotipos basados en su capacidad de proliferación y su crecimiento vigoroso . Se evaluó la respuesta de estas líneas al test de TTC. Para ello se pesaron 3 g de callo por línea, se agitaron durante 2 horas a 90 rpm en 25,2 ml de medio mLV sin reguladores de crecimiento (RC) y se alicuotaron en 10 crioviales . Un criovial se utilizó como control con células muertas.

Posteriormente se aplicó el protocolo de tinción con TTC en tres réplicas por cada línea y se midió la absorbancia a 500 nm con un espectrofotómetro *Cary*™ de Agilent Technologies.

Procedimiento general de crioconservación

En los experimentos de crioconservación llevados a cabo se estudiaron modificaciones del protocolo desarrollado por CANO et al. (2018), adaptado a las condiciones del laboratorio donde se realizó este estudio (Figura 3).

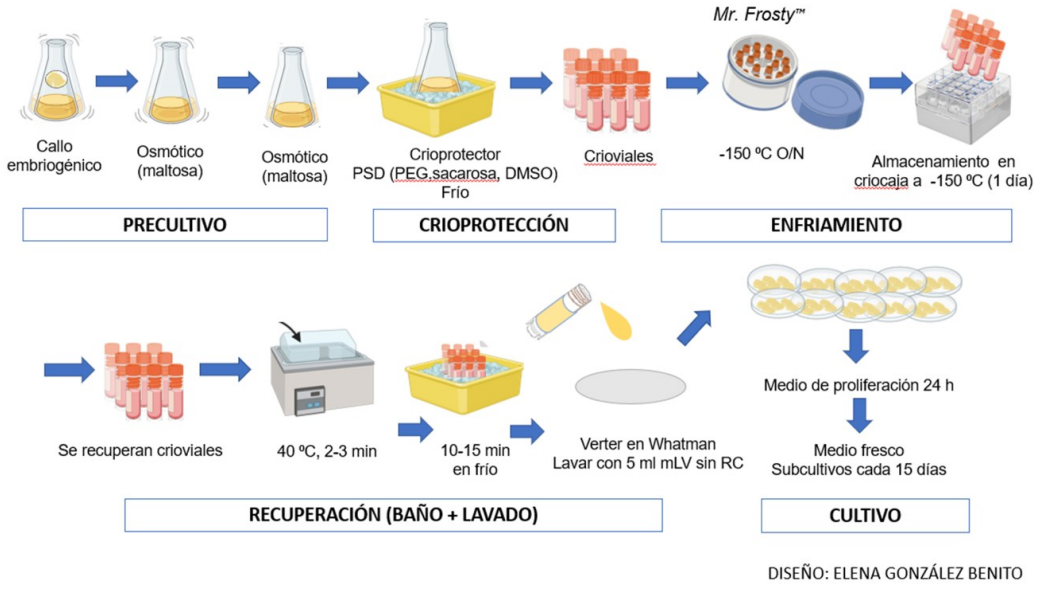

Figura 3. Esquema del procedimiento general de crioconservación del CE. El diagrama muestra el proceso completo de crioconservación, desde la preparación del CE hasta su recuperación y proliferación en medio fresco. PSD: PEG 4000 10%, p/v, sacarosa 10% p/v, DMSO 10% v/v. Diseñado por el equipo investigador.

Estudio del efecto de los crioprotectores

Para optimizar el protocolo de crioconservación, se estudió el efecto de los crioprotectores sobre las suspensiones celulares de *P. pinaster. S*e resuspendieron 1,5 g de CE que se alicuotaron en 5 crioviales por cada una de las líneas evaluadas.

En este estudio no se realizó el enfriamiento controlado ni el paso a ultracongelador, pero sí se añadió el pretratamiento con sacarosa y la solución crioprotectora PSD (Figura 3). Además, se mantuvo el lavado de recuperación.

La viabilidad celular se evaluó mediante test de TTC en tres muestras, mientras que las otras dos se utilizaron para comprobar la recuperación en medio de cultivo. Se compararon las absorbancias/mg obtenidas de las muestras tratadas con crioprotectores con controles sin crioprotectores y con controles negativos. Para el control sin crioprotectores (absoluto) se recogió CE de placas con 14 días en medio de cultivo semisólido.

Estudio de la velocidad de enfriamiento

El estudio de la velocidad de enfriamiento se realizó utilizando el dispositivo *Mr. Frosty*™, diseñado para obtener una velocidad de enfriamiento de 1 ºC/min cuando se incuba a -80 ºC, empleando isopropanol como aislante.

Para adaptarlo a las condiciones del laboratorio, donde se hizo el estudio, en el que el ultracongelador opera a -150 ºC en lugar de los -80 ºC, se utilizó una caja aislante de poliestireno expandido, equipada con diferentes capas de aislamiento para lograr mantener la tasa de enfriamiento cercana a 1 ºC/min. Se realizaron 30 pruebas en diversas condiciones, ajustando variables como el número y variedad de capas aislantes. La temperatura se monitoreó con un Data Logger Tinytag View 2 con una sonda Pt1000. Las pruebas incluyeron la combinación del uso de la caja aislante con diferentes tiempos de incubación previa (antes de introducir los crioviales) del dispositivo *Mr. Frosty*™ en temperaturas de -20 ºC, -150 ºC y temperatura ambiente, evaluando la tasa de enfriamiento.

Experimentos de evaluación, optimización y validación del protocolo de crioconservación

Se realizaron tres experimentos consecutivos, cada uno diseñado para abordar diferentes aspectos del proceso de crioconservación y asegurar la viabilidad y proliferación de las células embriogénicas. En todos los experimentos, se emplearon controles negativos con células muertas, controles con crioprotectores descritos en el apartado “Estudio del efecto de los crioprotectores” (Tratamiento 5) y controles sin crioprotectores o absolutos (Tratamiento 6).

Experimento 1

Se evaluaron cuatro tratamientos (con o sin caja aislante) en tres líneas embriogénicas seleccionadas previamente. En todos los tratamientos, el *Mr. Frosty*™ se incubó previamente durante 1 hora a -20 ºC. Una vez que se retiran los crioviales del *Mr. Frosty*™ (variando el momento con cada tratamiento) estos se transfieren al ultracongelador dentro de una criocaja, donde se almacenaron al menos un día antes de proceder a su recuperación. En el proceso de recuperación se realizó un paso por el baño de agua a 40 ºC durante 1-2 minutos y se aplicó un lavado con medio líquido sin RC.

Los tratamientos específicos de enfriamiento fueron los siguientes:

T1. *Mr. Frosty*™ en ultracongelador (-150 ºC) sin caja aislante O/N y posterior transferencia de los crioviales al ultracongelador.

T2. *Mr. Frosty*™ (-150 ºC), sin caja aislante, monitorizado hasta alcanzar -40 ºC.; después transferencia de los crioviales al ultracongelador.

T3. *Mr. Frosty*™ en caja aislante O/N (-150 ºC) y posteriormente se transfirieron los crioviales al ultracongelador.

T4. *Mr. Frosty*™ en caja aislante (-150 ºC) hasta alcanzar -40ºC, luego se transfirieron los crioviales al ultracongelador.

Para el test de viabilidad, se recogen tres réplicas de 30 mg, por cada una de las líneas estudiadas, de las cinco placas en recuperación, de las cuales dos se conservan para analizar el crecimiento del CE.

Experimento 2

Este experimento consistió en evaluar tratamientos similares al anterior, con modificaciones clave. Se ajustaron los tiempos de incubación previa del *Mr. Frosty*™ a -20 ºC durante 2 horas y se realizaron modificaciones en las capas aislantes de la caja logrando una velocidad de enfriamiento de 0,88 ºC/min. Además, se extendió el tiempo de calentamiento en el baño a 2-3 minutos. También se eliminó el proceso de lavado en el momento de recuperación de las muestras y se incorporó el uso de NL en algunos tratamientos .

Se pesaron 3 g de callo fresco para cada tratamiento, se alicuotaron en crioviales y se sometieron a pruebas de viabilidad con TTC y análisis de crecimiento en medio de cultivo al igual que en el experimento 1.

Los tratamientos aplicados fueron:

T1. *Mr. Frosty*™ sin caja aislante en ultracongelador (-150 ºC) O/N, después transferencia de los crioviales al ultracongelador.

T2. Igual que Tratamiento 1, pero los crioviales se introdujeron en NL 1 hora antes de transferirlos al ultracongelador

T3. Mr. Frosty™ en caja aislante mejorada hasta alcanzar -40 ºC, después transferencia de los crioviales al ultracongelador

T4: Igual que Tratamiento 3, pero los crioviales se introdujeron en NL 1 hora al alcanzar -40ºC y antes de transferirlos al ultracongelador.

Experimento 3

Un tercer experimento se diseñó basándose en los anteriores, seleccionando la

mejor línea y mejor tratamiento. Se pesaron 3 g de CE, que se disgregaron en medio mLV y se sometieron al tratamiento optimizado (Tratamiento T3 del experimento anterior). La recuperación se volvió a realizar sin solución de lavado y además se implementaron medidas adicionales para prevenir la contaminación bacteriana durante la fase de calentamiento. La viabilidad celular se evaluó mediante el test de tetrazolio y capacidad de crecimiento en medio de cultivo fresco. Se utilizaron cinco réplicas para el test de viabilidad y otras cinco para la recuperación en medio fresco mLV con RC.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, ya que los datos no cumplían los requisitos para un análisis paramétrico. La normalidad se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk, que mostró valores de $p < 0,05$, y la homogeneidad de las varianza se verificó con la prueba de Levene, confirmando la heterogeneidad entre los grupos. El análisis se realizó con el software estadístico R (R Core Team, 2021). Para las comparaciones múltiples de medias se usó el test de Dunn con corrección Bonferroni, para permitir identificar diferencias significativas.

4. Resultados

Puesta a punto del test de tetrazolio

Se evaluó la efectividad del protocolo de tinción con tetrazolio en diferentes líneas celulares, confirmando la funcionalidad del protocolo. Además, las células tratadas a 80 ºC durante una hora no presentaban tinción, lo que descarta falsos positivos. Aunque los dos tiempos de incubación estudiados (6 horas y O/N) mostraron una tinción adecuada, se optó por una incubación de 18 horas por su mejor adecuación a los horarios de laboratorio. Se confirmó que el peso recomendado de 50 mg de CE era manejable y adecuado para el ensayo (Figura 4).

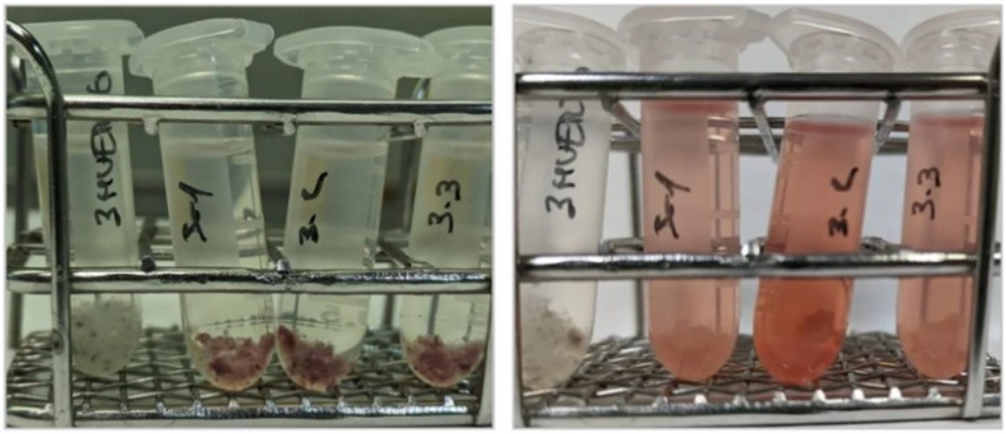

Figura 4. Muestras de CE sometidas a pruebas viabilidad con TTC. Primer tubo de

cada soporte: controles negativos para asegurar que no hay falsos positivos

Selección de genotipos

Se evaluó la efectividad del protocolo de tinción con tetrazolio en los cinco genotipos seleccionados. Todas las líneas celulares presentaron tinción, confirmando la efectividad del protocolo. Las líneas 2, 3 y 4 presentaron los valores más altos de absorbancia, indicando una mayor viabilidad celular, por lo que fueron seleccionadas para los experimentos de crioconservación. La línea 4 mostró el valor más alto, sugiriendo una mayor viabilidad.

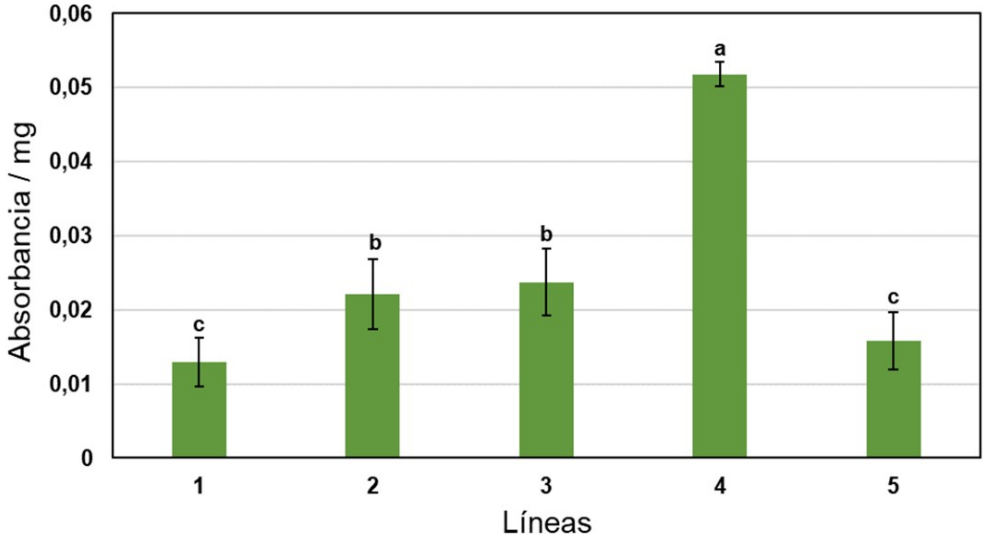

Figura 5. Absorbancia de cinco líneas celulares de P. pinaster tras tinción con tetrazolio. Barra= error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias según la prueba de Kruskall Wallis seguida de comparaciones múltiples con la prueba de Dunn (n=4, p < 0,05)

Estudio del efecto de los crioprotectores

El efecto de los crioprotectores sobre la viabilidad celular de las líneas embriogénicas 2, 3 y 4 se evaluó mediante el test de tetrazolio (TTC). Los resultados muestran que las líneas tratadas con crioprotectores presentan una mayor absorbancia en comparación con las líneas sin crioprotectores (Figura 6). La menor viabilidad observada en las muestras sin crioprotectores se debe a que el CE utilizado para estos controles se recogió el mismo día de la tinción (cuando llevaban 14 días de cultivo), lo que implicó menos tiempo en medio fresco y, por tanto, menor viabilidad

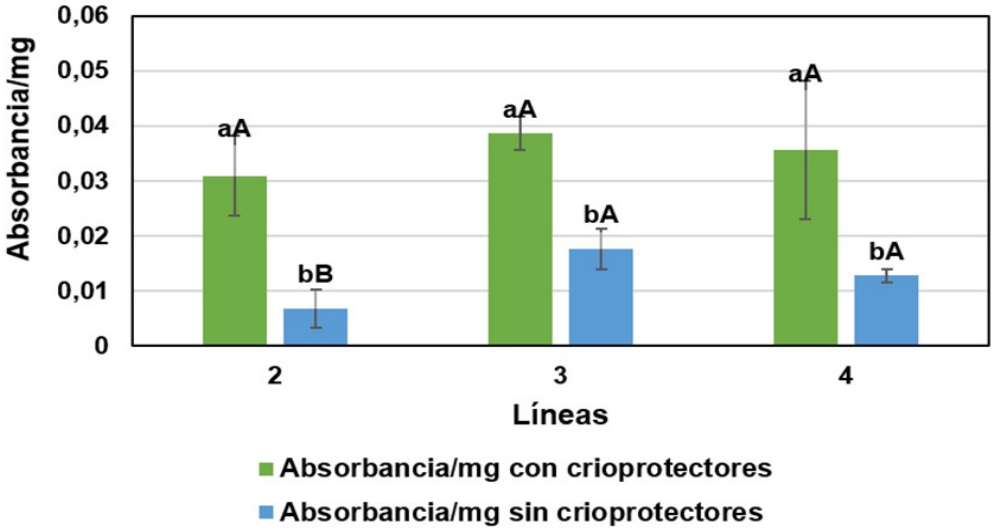

Figura 6. Viabilidad celular de tres líneas embriogénicas de P. pinaster evaluadas mediante test de tetrazolio, expresada como absorbancia por miligramo de tejido fresco, tras el tratamiento con y sin crioprotectores. Barra = error estándar. Letras minúsculas (a, b) indican diferencias significativas entre tratamientos (con o sin crioprotectores) dentro de la misma línea celular. Letras mayúsculas distintas (A, B) indican diferencias significativas entre líneas distintas dentro de un mismo tratamiento, según la prueba de Kruskall Wallis seguida de comparaciones múltiples con la prueba de Dunn (n=4, p < 0,05).

Estudio de la velocidad de enfriamiento

Los resultados más cercanos a la velocidad de enfriamiento deseada de 1 ºC/min se obtuvieron usando múltiples capas de aislamiento en una caja aislante mejorada. En este protocolo, el dispositivo *Mr. Frosty*™ se incubó durante 2 horas a -20 ºC, y los crioviales con las muestras se mantuvieron en hielo durante 15 minutos antes de ser rápidamente transferidos al *Mr. Frosty*™. Posteriormente, el dispositivo se colocó en la caja aislante y ésta se introdujo en el ultracongelador (-150 ºC). El monitoreo de la temperatura mostró que se alcanzó la temperatura de -40 ºC en 47-49 minutos, lo que corresponde a una velocidad de enfriamiento cercana a 1 °C/min (0,88 °C/min) (Figura 7). En cambio, cuando el *Mr. Frosty*™ se introdujo directamente en el ultracongelador sin la caja aislante, el tiempo necesario para alcanzar los -40 ºC fue de aproximadamente 17 minutos y la velocidad de enfriamiento fue muy superior a la deseada, alcanzando una tasa de 2,70 °C/min (Figura 7). Adicionalmente, la caja inicial sin mejora y con una incubación de 1 hora del *Mr. Frosty* a -20 ºC mostró una tasa de enfriamiento de 0,71 °C/min (Figura 7).

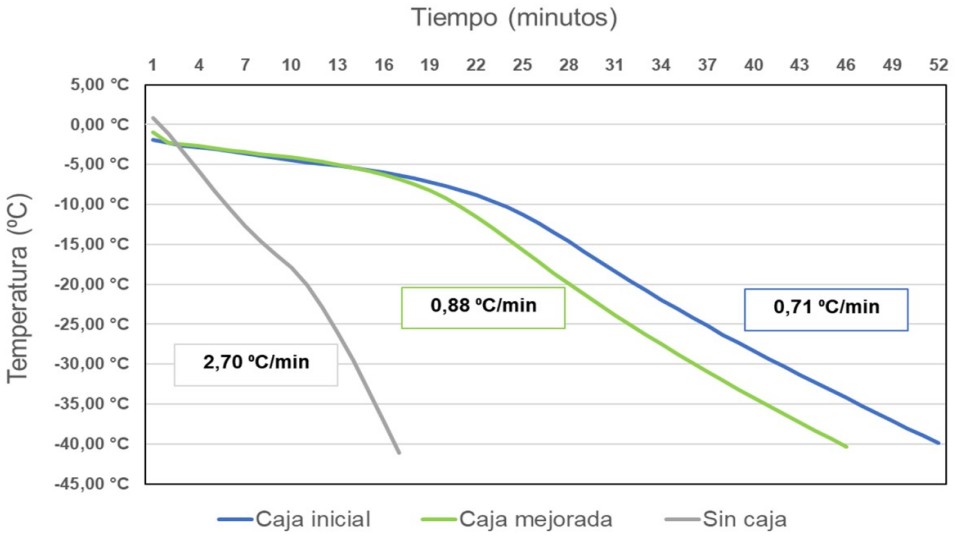

Figura 7. Control de la velocidad de enfriamiento dentro de un criovial en Mr. Frosty™, dentro de congelador de -150 ºC con caja aislante inicial (azul), caja aislante mejorada (naranja) y sin caja (gris). Velocidad en todas hasta alcanzar -40 ºC.

Experimentos de evaluación, optimización y validación del protocolo de crioconservación.

Experimento 1

En el Experimento 1 (Figura 8) se evaluaron los efectos de distintos tratamientos de crioconservación en la viabilidad de las líneas embriogénicas 2, 3 y 4. Los resultados muestran que los tratamientos T1, T2, T3 y T4 presentan valores de absorbancia muy bajos y, en consecuencia, bajas tasas de supervivencia. Estos resultados indican una recuperación insuficiente de las células embriogénicas. En contraste, los controles con crioprotectores (T5) y los controles absolutos (T6) muestran mayores valores de absorbancia y tasas de supervivencia, lo que confirma que las células embriogénicas sobreviven al tratamiento con crioprotectores. Dado que los resultados no fueron satisfactorios en términos de recuperación celular, se decidió realizar ajustes del protocolo en el siguiente experimento.

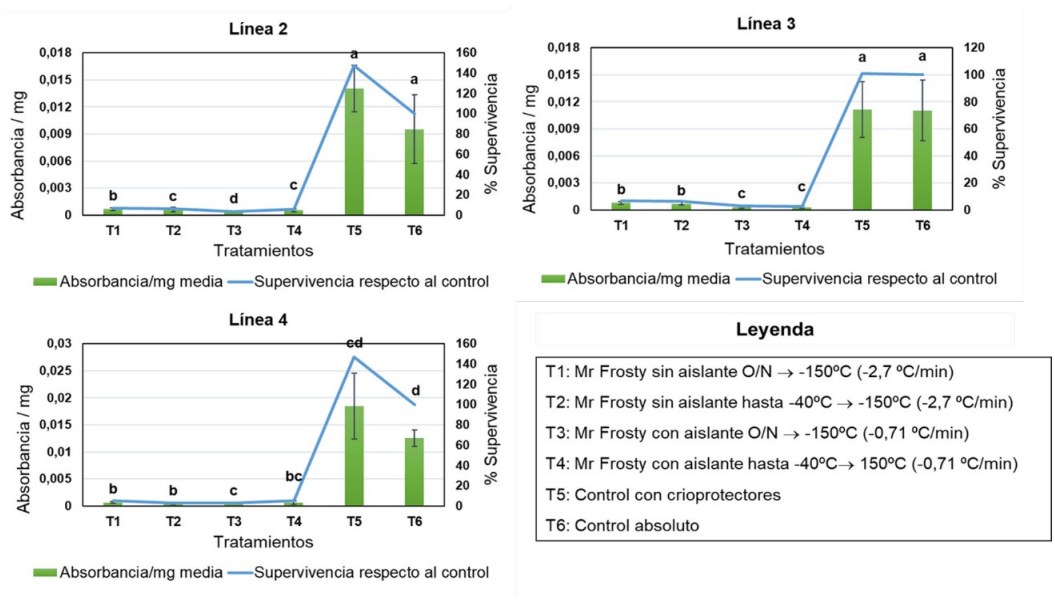

Figura 8. Absorbancia y supervivencia relativa al control para las tres líneas embriogénicas de P. pinaster evaluadas. En la leyenda se indica la velocidad de enfriamiento. Barra= error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias según la prueba de Kruskall Wallis seguida de comparaciones múltiples con la prueba de Dunn (n = 3, p < 0,05)

Experimento 2

Se evaluó el efecto de varias modificaciones en los tratamientos de crioconservación; específicamente la incubación previa durante 2 horas a -20 °C del *Mr. Frosty*™ y variaciones en las capas de la caja aislante (Figura 9). Además, se eliminó el proceso de lavado en el momento de recuperación de las muestras, lo que permitió recuperar una mayor cantidad de cultivo celular.

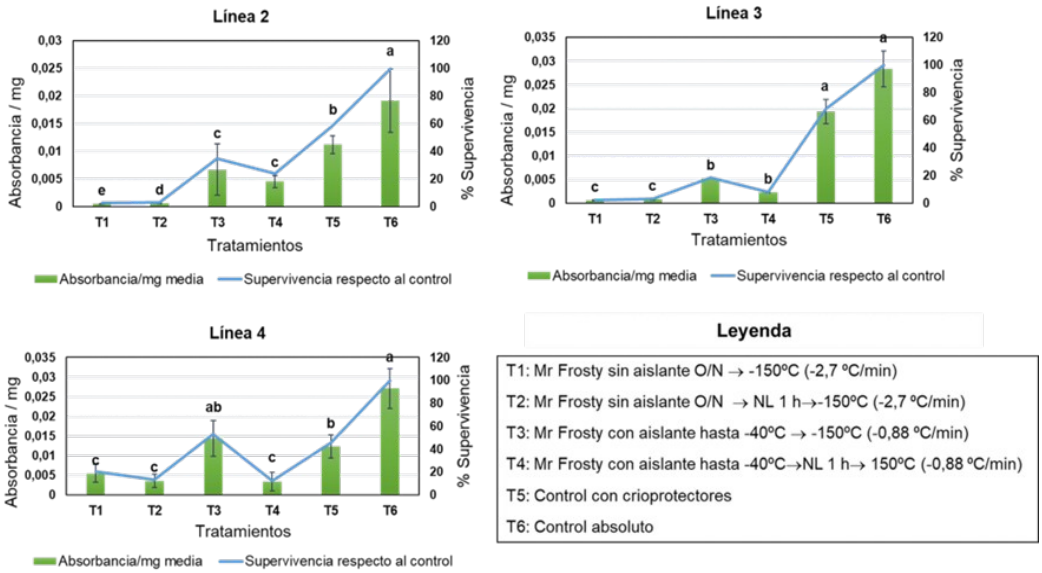

Figura 9. Absorbancia y supervivencia relativa al control para las tres líneas embriogénicas de P. pinaster evaluadas. En la leyenda se indica la velocidad de enfriamiento. Barra= error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias según la prueba de Kruskall Wallis seguida de comparaciones múltiples con la prueba de Dunn (n = 3, p < 0,05)

Con estos cambios se observaron mejoras significativas en la viabilidad celular en comparación con el experimento anterior, ya que todas las líneas embriogénicas presentaron mayores valores de absorbancia y tasas de supervivencia.

El tratamiento T3 (Figura 10) (*Mr. Frosty*™ con caja aislante mejorada hasta -40 °C, luego crioviales a ultracongelador a -150ºC) fue el más efectivo, especialmente para la línea 4.

Estos resultados indican que las modificaciones en el protocolo, incluyendo el ajuste del tiempo de incubación previa durante 2 horas a -20 °C del *Mr. Frosty*™, la extensión del tiempo de calentamiento en el baño y la eliminación del lavado en el momento de recuperación, contribuyeron a una mayor viabilidad celular.

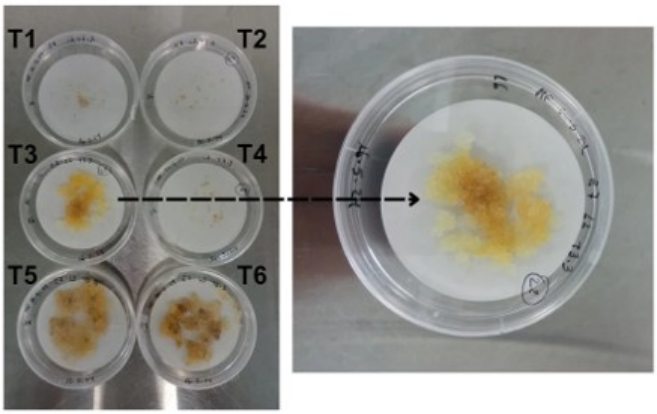

Figura 10. A la izquierda, recuperación de los diferentes tratamientos a los 30 días de su paso a medio fresco mLV de la línea 4. Cabe destacar que se debe refrescar el medio quincenalmente. Para una explicación de los tratamientos, ver Figura 10. A la derecha, detalle del tratamiento 3, mostrando el crecimiento celular después de la crioconservación.

Experimento 3

En este experimento se seleccionó la mejor línea (línea 4) y el mejor tratamiento del experimento anterior, para validar el protocolo optimizado y asegurar su aplicabilidad para la crioconservación de *P. pinaster*. Estos resultados confirmaron la viabilidad y eficacia del protocolo optimizado de crioconservación para la línea embriogénica 4. El tratamiento T3, considerado como el mejor tratamiento, mostró una supervivencia del 56,08 % con respecto al control absoluto (Figura 11).

Estos resultados validan el protocolo optimizado y demuestran su aplicabilidad

para la crioconservación de *P. pinaster*, asegurando la viabilidad y el crecimiento de las células embriogénicas tras el proceso de crioconservación.

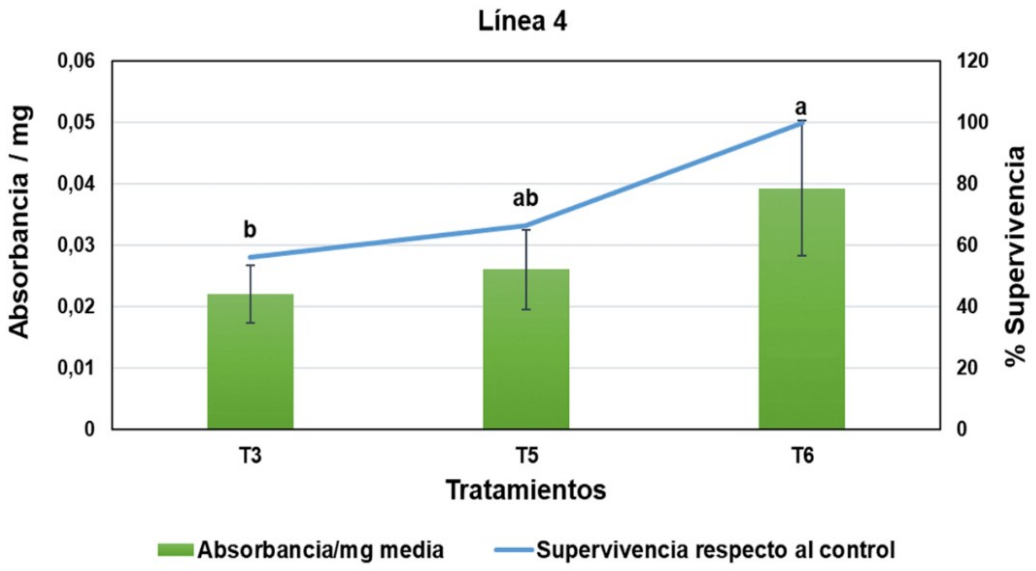

Figura 11. Absorbancia y supervivencia relativa al control para la línea embriogénica 4 de P. pinaster. Los tratamientos son: T3: Mejor tratamiento (incubación Mr. Frosty 2 horas a -20ºC, crioviales a -150ºC en caja aislante hasta -40ºC, paso directo a -150ºC). T5: Control con crioprotectores. T6: Control absoluto. Barra= error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias según la prueba de Kruskall Wallis seguida de comparaciones múltiples con la prueba de Dunn (n = 5, p < 0,05)

5. Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio serán relevantes para los programas de mejora genética de **P. pinaster**, ya que permitirán la conservación de material genético seleccionado y multiplicado como cultivos embriogénicos. Nuestros hallazgos coinciden con estudios previos que subrayan la efectividad de las técnicas de crioconservación para la preservación de genotipos superiores de coníferas (ÁLVAREZ ET AL., 2012; MARUM ET AL., 2004).

En nuestro estudio, seleccionamos cinco genotipos basándonos en su capacidad de proliferación y crecimiento vigoroso. Los resultados del test de viabilidad con absorbancia media mostraron diferencias significativas entre los genotipos. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos que subrayan la importancia de seleccionar genotipos con alta viabilidad para la crioconservación efectiva (BAJAJ, 1995; ISHIKAWA, 1994; KAVIANI, 2011). La puesta a punto del test de TTC fue exitosa, destacando la importancia de ajustar los tiempos de incubación para optimizar la determinación de la viabilidad celular (TANAKA ET AL., 2018). La inclusión de controles negativos permitió asegurar la ausencia de falsos positivos, lo cual fue validado en otros estudios (MATSUMOTO, 2017).

Es fundamental evaluar el efecto de los crioprotectores sobre las suspensiones celulares debido a su toxicidad. Estos compuestos pueden reducir la supervivencia celular a lo largo del tiempo, por lo que es importante comprobar si su uso provoca una disminución de la misma. En nuestro estudio, las suspensiones tratadas con crioprotectores mostraron mayor viabilidad en comparación con las muestras sin crioprotectores. Esto se debió a que las muestras tomadas para el control absoluto se encontraban al final del ciclo de cultivo. Cabe destacar que estos cultivos deben ser subcultivados quincenalmente para mantener su crecimiento activo. Se confirmó que la solución crioprotectora PSD no es perjudicial para la supervivencia celular, coincidiendo con investigaciones previas que destacan la importancia de los crioprotectores en la crioconservación del germoplasma (KAVIANI, 2011; VOLK & WALTERS, 2006; KACZMARCZYK ET AL., 2011). En estudios anteriores se han analizado diferentes soluciones crioprotectoras y sus tiempos de exposición para evaluar su impacto, concluyendo que, aunque algunos de estos productos pueden tener efectos tóxicos a ciertas concentraciones, su uso correcto no afecta negativamente la viabilidad celular (HEINE-DOBBERNACK ET AL., 2008).

Nuestros hallazgos sobre la velocidad de enfriamiento revelaron que ajustar la tasa de enfriamiento es fundamental para prevenir la formación de cristales de hielo que pueden dañar las células o provocar una deshidratación excesiva, ya que una velocidad de enfriamiento demasiado lenta puede concentrar solutos dentro de las células y provocar daños coligativos (BENSON, 2008). El protocolo desarrollado con múltiples capas de aislamiento y una incubación previa del dispositivo Mr. Frosty™ durante 2 horas a -20 °C resultó en una velocidad de enfriamiento cercana a la deseada de 1 ºC/min, lo que mejoró la viabilidad celular. Estos hallazgos concuerdan con estudios que han demostrado la importancia de las tasas de enfriamiento controladas para evitar la formación de cristales de hielo intracelulares (BAJAJ, 1995; PANIS ET AL., 2005).

Los resultados del Experimento 1 mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. Las líneas celulares sometidas a los tratamientos con y sin crioprotectores (T5 y T6) presentaron una mayor viabilidad celular en comparación con los tratamientos crioconservados. La incubación del Mr. Frosty™ a -20 °C durante una hora, utilizando la caja inicial que proporcionó una velocidad de 0,71 °C/min, reveló la necesidad de ajustar la fase de enfriamiento controlado, ya que los tratamientos crioconservados mostraron una baja viabilidad celular. Las velocidades de enfriamiento más rápidas, sin caja aislante, presentaron menores tasas de viabilidad, lo cual puede atribuirse a la formación de cristales de hielo intracelulares (REED, 2008).

En el Experimento 2, los ajustes en los tiempos de incubación del Mr. Frosty™ durante 2 horas a -20 °C y el uso de la caja aislante mejorada, con una velocidad de enfriamiento de 0,88 °C, mejoraron significativamente la viabilidad celular. El aumento del tiempo de calentamiento y la eliminación del proceso de lavado también contribuyeron a una mayor viabilidad, probablemente debido a la reducción del estrés osmótico en las células. Este hallazgo es consistente con

investigaciones que sugieren que la manipulación mínima de las muestras durante el proceso de crioconservación puede aumentar la viabilidad celular (KAVIANI, 2011). Se comprobó que estos ajustes resultaron ser positivos para mejorar la supervivencia de las células crioconservadas.

El Experimento 3 validó el mejor tratamiento y mejor línea, confirmando la eficacia del protocolo optimizado con la línea 4, corroborando la importancia del ajuste de la velocidad de enfriamiento y de los procedimientos de recuperación. La realización de los experimentos extremando las condiciones estériles fue crucial para evitar la contaminación, que había sido una limitación en experimentos anteriores. Estos resultados subrayan la importancia del mantenimiento de las condiciones de esterilidad en cada paso del procedimiento de crioconservación (BENSON, 2008; ENGELMANN, 2004).

Los hallazgos de este estudio son comparables con estudios previos que también destacan la necesidad de protocolos de enfriamiento precisos para mejorar la viabilidad celular en crioconservación. Por ejemplo, REED (2008) y SAKAI (2004) enfatizan la importancia de las tasas de enfriamiento controladas para prevenir la formación de cristales de hielo intracelulares. BENSON (2008) también destaca la relevancia de minimizar el estrés osmótico durante el proceso de crioconservación, provocado durante los pasos previos al enfriamiento (crioprotección) o durante la recuperación. Además, investigaciones recientes han resaltado la importancia de la esterilidad y la optimización de los protocolos de crioconservación para diferentes especies vegetales (PANIS ET AL., 2020; BETTONI & VOLK, 2020).

Futuras investigaciones deberían ampliar el número de genotipos evaluados y estudiar los puntos clave del protocolo para mejorar la supervivencia. También sería beneficioso investigar el impacto de diferentes crioprotectores y combinaciones de estos para optimizar aún más los protocolos de crioconservación. Asimismo sería recomendable realizar estudios de la viabilidad celular a largo plazo, probando diferentes tiempos de almacenamiento. La comprobación de la estabilidad genética de las muestras crioconservadas en diferentes etapas del proceso de crioconservación se podría realizar utilizando marcadores moleculares epigenéticos. Además, es importante verificar si la capacidad embriogénica y la maduración de los embriones se ven afectadas por la crioconservación, tal y como se hizo en otros estudios como el de ÁLVAREZ ET AL. (2012). Finalmente, se podrían explorar otras técnicas de crioconservación como la vitrificación directa y la encapsulación-desecación.

6. Conclusiones

El procedimiento de crioconservación de cultivos embriogénicos de *P. pinaster* desarrollado para las condiciones del laboratorio del Vivero de Maceda en Ourense, ha demostrado ser efectivo, con tasas de recuperación cercanas al 60% de la viabilidad de los cultivos control, que respaldan la viabilidad del uso de esta técnica. En particular, la crioconservación de líneas embriogénicas utilizando una solución crioprotectora combinada de PEG, sacarosa y DMSO (solución PSD), aplicada durante 30 minutos en frío, ha demostrado ser segura para preservar los

cultivos embriogénicos. La combinación de estos crioprotectores, junto con el control preciso de la velocidad de enfriamiento ha contribuido significativamente a la mejora del protocolo y a minimizar el daño causado por la formación de cristales de hielo y la deshidratación celular. Esta metodología permite no solo la preservación de la capacidad embriogénica sino también la continuidad en la producción de plantas vigorosas, por lo que tiene el potencial de contribuir significativamente a los esfuerzos de mejora genética y conservación de *Pinus pinaster*, asegurando la sostenibilidad de sus recursos genéticos.

7. **Agradecimientos** Agradecemos a la Empresa de Transformación Agraria S.A., S.M.E., M.P. (TRAGSA) por facilitar el desarrollo de este estudio, así como al Centro de Investigaciones Forestales de Lourizá por proporcionar el material vegetal necesario.También agradezcemos la orientación científica de M. Elena González Benito (Universidad Politécnica de Madrid) y de Beatriz Cuenca Valera (TRAGSA), así como el apoyo inicial de Francisco Lario en la elección del tema de investigación.

8. **Bibliografía**

ÁLVAREZ, J. M.; CORTIZO, M.; ORDÁS, R. J.; 2012. Cryopreservation of somatic embryogenic cultures of *Pinus pinaster*: effects on regrowth and embryo maturation. *Cryo Lett.* 33(6), 476–484. https://doi.org/10.33678/cl.2012.23

ARRILLAGA, I.; MORCILLO, M.; ZANÓN, I.; LARIO, F.; SEGURA, J.; SALES, E.; 2019. New approaches to optimize somatic embryogenesis in maritime pine. *Front. Plant Sci.* 10, 138. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00138

AYALA, L. P. E.; LUNA, C. V.; BRUGNOLI, E. A.; ESPASANDIN, F. D.; DUARTE, M. J.; GONZÁLEZ, A. M.; GAUCHAT, M. E.; MONCALEÁN GUILLÉN, P.; SANSBERRO, P. A.; 2023. Cryopreservation of mature zygotic embryos, shoot bud regeneration, and field establishment of *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *Pinus caribaea* var. *hondurensis* in vitro-derived plants. *Trees Struct. Funct.* 37(2), 417–433. https://doi.org/10.1007/s00468-022-02359-0

BAJAJ, Y. P. S.; 1995. Cryopreservation of somatic embryos. En Y. P. S. Bajaj (Ed.), *Somatic embryogenesis and synthetic seed I. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 30, 371–397. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03091-2_15

BARTHOLOMÉ, J.; VAN HEERWAARDEN, J.; ISIK, F.; BOURY, C.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. C.; PLOMION, C.; 2016. Performance of genomic prediction within and across generations in maritime pine. *BMC Genomics* 17(1), 604. https://doi.org/10.1186/s12864-016-2879-8

BENSON, E. E.; 2008. Cryopreservation theory. En Reed, B. M. (Ed.), *Plant cryopreservation: A practical guide*, 15–32. Springer Science+Business Media. Nueva York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72276-4_2

BERCETCHE, J.; PÂQUES, M.; 1995. Somatic Embryogenesis in Maritime Pine (*Pinus pinaster*). En Jain, S. M.; Gupta, P. K.; Newton, R. J. (Eds.), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Forestry Sciences*, 3, 221–242. Springer. Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0960-4_14

BETTONI, J. C.; VOLK, G. M.; 2020. Cryotherapy Using Shoot Tip Cryopreservation. En Volk, G. M.; Balunek, E.; Chen, K. (Eds.), *Training in Plant Genetic Resources: Cryopreservation of Clonal Propagules*, 35–52. Colorado State University. Colorado. https://colostate.pressbooks.pub/clonalcryopreservation/chapter/cryotherapy-using-shoot-tip-cryopreservation/

CANO, M.; MORCILLO, A.; HUMÁNEZ, A.; MENDOZA-POUDEREUX, I.; ALBORCH, A.; SEGURA, J.; ARRILLAGA, I.; 2018. Maritime Pine *Pinus pinaster* Aiton. En Jain, S. M.; Gupta, P. K. (Eds.), *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants, Forestry Sciences*, 84, 167–179. Springer. Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-89483-6_13

CARNEROS, E.; YAKOVLEV, I.; VIEJO, M.; OLSEN, J. E.; FOSSDAL, C. G.; 2017. The epigenetic memory of temperature during embryogenesis modifies the expression of bud burst-related genes in Norway spruce epitypes. *Planta* 246(3), 553–566. https://doi.org/10.1007/s00425-017-2713-9

ENGELMANN, F.; 2004. Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40(5), 427–433. https://doi.org/10.1079/ivp2004541

ENGELMANN, F.; 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 47(1), 5–16. https://doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2

GAO, F.; PENG, C.; WANG, H.; NIKOLAEVNA, I.; MIKHAYLOVICH, A.; SHEN, H.; YANG, L.; 2020. Key techniques for somatic embryogenesis and plant regeneration of *Pinus koraiensis*. *Forests* 11(9). https://doi.org/10.3390/F11090912

HARGREAVES, C. L.; GRACE, L. J.; HOLDEN, D. G.; 2002. Nurse culture for efficient recovery of cryopreserved *Pinus radiata* D. Don embryogenic cell lines. *Plant Cell Rep.* 21(1), 40–45. https://doi.org/10.1007/s00299-002-0478-4

HEINE-DOBBERNACK, E.; KIESECKER, H.; SCHUMACHER, H. M.; 2008. Cryopreservation of dedifferentiated cell cultures. En Reed, I. (Ed.), *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, 387–400. Springer Science+Business Media. Nueva York.

ISHIKAWA, M.; 1994. Recent progress in cryopreservation of plant genetic resources. En *JIRCAS International Symposium Series*, 2, 155–167.

KACZMARCZYK, A.; FUNNEKOTTER, B.; MENON, A.; YE, P.; AL-HANBALI, A.; BUNN, E.; L., R.; 2012. Current issues in plant cryopreservation. En Katkov, I. (Ed.), *Current Issues in Plant Cryopreservation*, 417–438. InTechOpen. Londres. https://doi.org/10.5772/32860

KAVIANI, B.; 2011. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *AJCS* 5(6), 778–800. https://cabidigitallibrary.org

KIM, B. N.; KIM, J. H.; AHN, J. Y.; PARK, J. H.; 2020. A short review of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Toxicol. Environ. Health Sci.* 12(4), 297–304. https://doi.org/10.1007/s13530-020-00068-0

KONG, L.; VON ADERKAS, P.; 2011. A novel method of cryopreservation without a cryoprotectant for immature somatic embryos of conifer. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 106(1), 115–125. https://doi.org/10.1007/s11240-010-9899-x

LATUTRIE, M.; ARONEN, T.; 2013. Long-term cryopreservation of embryogenic *Pinus sylvestris* cultures. *Scand. J. Forest Res.* 28(2), 103–109. https://doi.org/10.1080/02827581.2012.701325

LINEROS, Y.; BALOCCHI, C.; MUÑOZ, X.; SÁNCHEZ, M.; RÍOS, D.; 2018. Cryopreservation of *Pinus radiata* embryogenic tissue: effects of cryoprotective pretreatments on maturation ability. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 135(2), 357–366. https://doi.org/10.1007/s11240-018-1469-7

MARUM, L.; ESTÊVÃO, C.; OLIVEIRA, M. M.; AMÂNCIO, S.; RODRIGUES, L.; MIGUEL, C.; 2004. Recovery of cryopreserved embryogenic cultures of maritime pine: effect of cryoprotectant and suspension density. *Cryo Lett.* 25(5), 363–374.

MATSUMOTO, T.; 2017. Cryopreservation of plant genetic resources: Conventional and new methods. *Rev. Agric. Sci.* 5, 13–20. https://doi.org/10.7831/ras.5.13

MENDOZA-POUDEREUX, I.; CANO, M.; SOLÍS, M. T.; ESTEVE-DÍAZ, F.; TESTILLANO, P. S.; SEGURA, J.; SALES, E.; ARRILLAGA, I.; 2022. Assessment of dynamics of global DNA methylation during the cryopreservation process of *Pinus pinaster* embryogenic lines. *bioRxiv*. https://doi.org/10.1101/2022.02.27.481657

MENÉNDEZ GUTIÉRREZ, M.; 2017. Resistencia de *Pinus pinaster* Ait. al marchitamiento del pino causado por *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Burher), Nickle. Tesis doctoral, Universidad de Vigo. http://hdl.handle.net/11093/864

MINISTERIO PARA LA TRANSICIÓN ECOLÓGICA Y EL RETO DEMOGRÁFICO; 2021.

Anuario de Estadística Forestal. https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/estadisticas/forestal_anuario_2018.html

PANIS, B.; NAGEL, M.; VAN DEN HOUWE, I.; 2020. Challenges and prospects for the conservation of crop genetic resources in field genebanks, in in vitro collections and/or in liquid nitrogen. *Plants* 9(12), 1634. https://doi.org/10.3390/plants9121634

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R.; 2005. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. *Plant Sci.* 168(1), 45–55. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.07.022

PLOMION, C.; BARTHOLOMÉ, J.; LESUR, I.; BOURY, C.; RODRÍGUEZ-QUILÓN, I.; LAGRAULET, H.; EHRENMANN, F.; BOUFFIER, L.; GION, J. M.; GRIVET, D.; DE MIGUEL, M.; DE MARÍA, N.; CERVERA, M. T.; BAGNOLI, F.; ISIK, F.; VENDRAMIN, G. G.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. C.; 2016. High-density SNP assay development for genetic analysis in maritime pine (*Pinus pinaster*). *Mol. Ecol. Resour.* 16(2), 574–587. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12464

PRIETO-RECIO, C.; MARTÍN-GARCÍA, J.; BRAVO, F.; DIEZ, J. J.; 2015. Unravelling the associations between climate, soil properties and forest management in *Pinus pinaster* decline in the Iberian Peninsula. *Forest Ecol. Manag.* 356, 74–83. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.07.033

RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A. (Ed.); 2022. *Somatic Embryogenesis: Methods and Protocols*. Springer US. Nueva York. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2485-2

REED, B. M.; 2008. Cryopreservation—Practical considerations. En Reed, B. M. (Ed.), *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, 3–13. Springer Science+Business Media. Nueva York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72276-4_1

RIBEIRO, S.; GASPAR, M. J.; LIMA-BRITO, J.; FONSECA, T.; SOARES, P.; CERVEIRA, A.; FERNANDES, P. M.; LOUZADA, J.; CARVALHO, A.; 2023. Impact of fire recurrence and induced water stress on seed germination and root mitotic cell cycle of *Pinus pinaster* Aiton. *Forests* 14(1), 78. https://doi.org/10.3390/f14010078

SAKAI, A.; 2004. Plant cryopreservation. En Fuller, B.; Lane, N.; Benson, E. E. (Eds.), *Life in the Frozen State*, 355–372. CRC Press. Boca Raton. https://doi.org/10.1201/9780203647073

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T.; 2008. Development of PVS-based vitrification and encapsulation–vitrification protocols. En Reed, B. M. (Ed.), *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, 33–57. Springer Science+Business Media. Nueva York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72276-4_3

SALAJ, T.; MATUŠÍKOVÁ, I.; FRÁTEROVÁ, L.; PIRŠELOVÁ, B.; SALAJ, J.; 2011. Regrowth of embryogenic tissues of *Pinus nigra* following cryopreservation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 106(1), 55–61. https://doi.org/10.1007/s11240-010-9893-3

SALAJ, T.; MATUŠÍKOVÁ, I.; SWENNEN, R.; PANIS, B.; SALAJ, J.; 2012. Long-term maintenance of *Pinus nigra* embryogenic cultures through cryopreservation. *Acta Physiol. Plant.* 34(1), 227–233. https://doi.org/10.1007/s11738-011-0821-x

SÁNCHEZ-SALGUERO, R.; NAVARRO-CERRILLO, R. M.; CAMARERO, J. J.; FERNÁNDEZ-CANCIO, Á.; 2012. Selective drought-induced decline of pine species in southeastern Spain. *Clim. Change* 113(3–4), 767–785. https://doi.org/10.1007/s10584-011-0372-6

SANTOS DEL BLANCO, L.; CHAMBEL, M. R.; NOTIVOL PAÍNO, E.; ALÍA MIRANDA, R.; CLIMENT, J.; 2013. Ecología evolutiva de la reproducción en dos pinos mediterráneos: *Pinus pinaster* y *Pinus halepensis*. En *6º Congreso Forestal Español. Montes: Servicios y desarrollo rural: Vitoria-Gasteiz, 10–14 de junio de 2013*. Sociedad Española de Ciencias Forestales. http://hdl.handle.net/10532/2299

TANAKA, D.; NIINO, T.; UEMURA, M.; 2018. Cryopreservation of plant genetic resources. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1081, 355–369. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1244-1_19

TAPIAS, R.; CLIMENT, J.; PARDOS, J. A.; GIL, L.; 2004. Life histories of Mediterranean pines. *Plant Ecol.* 171(1), 53–68. https://doi.org/10.1023/B:VEGE.0000029383.72609.f0

URIARTE, R.; 1995. La industrialización del bosque en la España interior: producción y cambio técnico en la industria resinera (1860–1914). *Rev. Hist. Econ. / J. Iber. Latin Am. Econ. Hist.* 13(3), 509–551. https://doi.org/10.1017/S0212610900005292

VIZCAÍNO-PALOMAR, N.; REVUELTA-EUGERCIOS, B.; ZAVALA, M. A.; ALÍA, R.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. C.; 2014. The role of population origin and microenvironment in seedling emergence and early survival in Mediterranean maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton). *PLOS ONE* 9(10), e109132. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109132

VOLK, G. M.; WALTERS, C.; 2006. Plant vitrification solution two lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. *Cryobiology* 52(1), 48–61. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.09.004

ZAS ARREGUI, R.; MERLO, E.; 2008. El programa de mejora genética de *Pinus pinaster* en Galicia. *Bol. Inf. CIDEU* 6–7, 5–24. http://hdl.handle.net/10261/45946

9º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL
2025 GIJÓN | 16-20 JUNIO