



# 7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios  
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia  
Cáceres, Extremadura

---

---

7CFE01-297

---

---

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales  
**Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017**  
**ISBN 978-84-941695-2-6**

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

## PROPAGACIÓN DE CASTAÑO A GRAN ESCALA USANDO MICROPROPAGACIÓN FOTOAUTOTRÓFICA

CUENCA VALERA, B.<sup>1</sup>, LUQUERO RAMOS, L.<sup>2</sup>, OCAÑA BUENO, L.<sup>2</sup>, VIDAL GONZÁLEZ, N.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>TRAGSA. Vivero de Maceda. <sup>2</sup>TRAGSA. Departamento de Tecnología de la Información. Subdirección de Soporte Técnico a Innovación. <sup>3</sup>Dpto. Fisiología Vegetal. Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia. IIAG (CSIC)

### Resumen

En este trabajo se presentan los resultados de aplicar por primera vez las condiciones fotoautotróficas al cultivo *in vitro* de castaño, a fin de incrementar la calidad de la planta durante las etapas de multiplicación, enraizamiento y aclimatación, y favorecer su propagación a gran escala. Para la etapa de multiplicación, los experimentos realizados han permitido diseñar un protocolo eficaz de cultivo sin aporte de azúcares exógenos, que se utilizó con 4 genotipos de castaño resistentes a la tinta. Este protocolo consiste en disponer segmentos apicales y basales en biorreactores de 10 L, usando medio líquido y dados de lana de roca como soporte, y someterlos a alta intensidad lumínica y ventilación forzada con aire enriquecido en CO<sub>2</sub>. Para el enraizamiento se utilizaron 15 genotipos que fueron tratados con inmersión basal en ácido indol-3-butírico, seguido de cultivo en biorreactores de 16 L sobre bloques de lana de roca en medio sin azúcar y con altos niveles de CO<sub>2</sub>. Los porcentajes de enraizamiento y aclimatación fueron elevados y permitieron aplicar este sistema con eficiencia a todos los genotipos estudiados.

### Palabras clave

*Castanea*, *in vitro*, enraizamiento, yemas axilares, medio líquido.

## 1. Introducción

El castaño europeo, (*Castanea sativa* Mill.), se encuentra en regresión debido a la expansión de la tinta, causada por *Phytophthora cinnamomi* y *P. cambivora*. Para paliar este problema, se han obtenido árboles con diversos grados de resistencia mediante hibridaciones del castaño europeo con castaños asiáticos (*C. crenata* y *C. mollissima*), que deben ser propagados vegetativamente (GONZÁLEZ et al. 2011). El castaño es recalcitrante a la macropropagación, por lo cual se han desarrollado protocolos de micropropagación en medio gelificado con agar (VIEITEZ et al. 2007). Además, para reducir los costes de producción y mejorar la calidad de la planta recientemente se han propuesto protocolos de cultivo en medio líquido, usando sistemas de inmersión temporal (VIDAL et al. 2015) y continua (CUENCA et al. 2015), pero añadiendo azúcares como fuente de carbono.

La propagación fotoautotrófica (PAM) consiste en la eliminación del azúcar exógeno del medio, a fin de promover la actividad fotosintética de los tejidos. Se considera que los brotes que se cultivan en PAM se encuentran en un estado fisiológico más saludable y mejor adaptados a la aclimatación que aquellos cultivados en presencia de azúcar bajo condiciones fotomixotróficas (XIAO et al. 2011).

## 2. Objetivos

El objetivo de este estudio es propagar clones de castaño resistentes la tinta bajo condiciones fotoautotróficas, tanto durante la etapa de multiplicación como durante el enraizamiento.



### 3. Metodología

Los brotes se cultivaron en un sistema de inmersión continua usando biorreactores adaptados en nuestros laboratorios a partir de envases alimentarios de 10 y 16 L (Lock&Lock®), a los que se conectaron filtros de 0.2 µm para recibir ventilación forzada con aire enriquecido o no en CO<sub>2</sub>. Se dispusieron en una unidad experimental descrita previamente (CUENCA et al. 2015), bajo un fotoperíodo de 16 h suministrado por luces LED blancas (50-150 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) con 25° C en el período de luz y 20° C en el de oscuridad. Como condiciones estándar se consideraron niveles ambientales de CO<sub>2</sub> (~ 400 ppm) y baja intensidad lumínica (flujo de fotones fotosintéticos (PPF) ~ 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), y como condiciones fotoautotróficas niveles de CO<sub>2</sub> elevados (~ 2000 ppm) y alto PPF (~ 150 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

Para los estudios de proliferación, los brotes de 4 genotipos de castaño (C042, C053, P042 y P043) se cultivaron en biorreactores de 10 L con 1 L de medio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) con los nitratos reducidos a la mitad (MSN<sup>1/2</sup>) y 0.05 mg/L de N6-benzyladenina (BA). Se utilizaron cubos de lana de roca (1 cm<sup>3</sup>) como material de soporte. Se evaluaron los siguientes parámetros: tipo de explanto (secciones apicales y secciones basales unidas al callo basal), tamaño del explanto (1,5 o 3 cm), porcentaje de sacarosa añadida al medio (0, 1 y 3 % (p/v)), intensidad de luz (PPF de 50 y 150 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y niveles de CO<sub>2</sub> (400 y 2000 ppm).

La evaluación de resultados se realizó mediante la cuantificación de las siguientes variables a las 5 semanas del cultivo: 1) n° de brotes/explanto (NB), 2) coeficiente de multiplicación (CM), calculado como el n° de nuevos segmentos obtenidos por explanto inicial, 3) la longitud del brote más largo de cada explanto (LB), 4) el n° de brotes enraizables por explanto (BE, brotes mayores de 3-4 cm con un ápice en crecimiento activo), 5) niveles de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, b y carotenoides, extraídos con dimetilformamida y cuantificados por el método de WELLBURN (1994)).

Para los experimentos de enraizamiento se utilizaron brotes de 15 genotipos de castaño, que se sometieron a inmersión basal en 1 g L<sup>-1</sup> de AIB (ácido indol-3-butírico) durante 2 min, antes de su transferencia a biorreactores de 16 L con 2,5 L de medio GD (GRESSHOFF & DOY, 1972) con 1/3 de sus macronutrientes y sin reguladores de crecimiento ni sacarosa. Los biorreactores se situaron bajo luces LED a 150 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, y se evaluaron parámetros como la forma y tamaño de los bloques de lana de roca utilizados como sustrato (Kiemplugs y Blocks AO de Grodan®), y los niveles de CO<sub>2</sub> (400 a 2000 ppm), en función de las tasas de enraizamiento tras 4 semanas de cultivo y el éxito en la aclimatación dos meses después de la inducción de raíces.

El efecto de los diferentes parámetros evaluados sobre las variables medidas se evaluó mediante Análisis de Varianza (ANOVA1 o ANOVA2). Se utilizaron 3 repeticiones de 24 explantos cada una. La comparación entre medias se realizó mediante el test de la Diferencia Mínima Significativa (DMS) al 5% de probabilidad (p = 0,05). Previamente al análisis de la varianza se comprobaron las hipótesis de homocedasticidad, normalidad e independencia, y los datos porcentuales fueron transformados mediante la raíz cuadrada del arcoseno.

### 4. Resultados y discusión

#### *Proliferación:*

En los primeros experimentos realizados sin sacarosa no se obtuvo crecimiento. Para modificar el estado fisiológico de los brotes, estos se cultivaron en concentraciones decrecientes de sacarosa (1 y 0,5 %) durante al menos 3 subcultivos. Durante estos experimentos preliminares se observó que las secciones apicales mostraban poca respuesta al cultivo, por lo cual se ajustó el tamaño de estos segmentos para que pudieran sobrevivir en bajos niveles de

azúcares. El efecto de incrementar el tamaño del explanto en la proliferación de secciones apicales del clon P042 en condiciones estándar y con sacarosa 3% se muestra a continuación (Figura 1a). Incluso en estas condiciones fotomixotróficas, las secciones de 1,5 cm (con 1 o 2 hojas) mostraron menor proliferación que las secciones de 3 cm con 4 hojas.

El papel del tamaño del explanto en la propagación convencional ya había sido citado por PIERIK (1987), que señaló además que los explantos grandes podrían mostrar menos dependencia de la adición de nutrientes y azúcares. MIYASHITA et al. (1996) observaron que los explantos de patata con hojas más grandes respondieron mejor a al cultivo en PAM que los que tenían hojas pequeñas o no tenían hojas. Por otra parte, MINGOZZI et al. (2009) no pudieron obtener proliferación de *Populus deltoides* en PAM cuando utilizaron como explantos secciones de 1 cm sin hojas. Por estos motivos, en los experimentos siguientes se utilizaron secciones basales o apicales de 3-4 cm con al menos 4 hojas expandidas.

Para estudiar el efecto de los niveles de sacarosa en brotes cultivados en niveles ambientales de CO<sub>2</sub> (400 ppm), se cultivaron secciones apicales y basales de 3 cm del clon P043 bajo alta intensidad lumínica con sacarosa 1% y 3% (Figura 1b). En ambas condiciones se obtuvieron buenos niveles de proliferación, aunque las secciones basales tratadas con 3% de sacarosa produjeron significativamente más segmentos que las cultivadas con menos sacarosa. Resultados similares fueron observados en *Phalaenopsis* (YOON et al. 2009) y *Pfaffia glomerata* (SALDANHA et al. 2013).

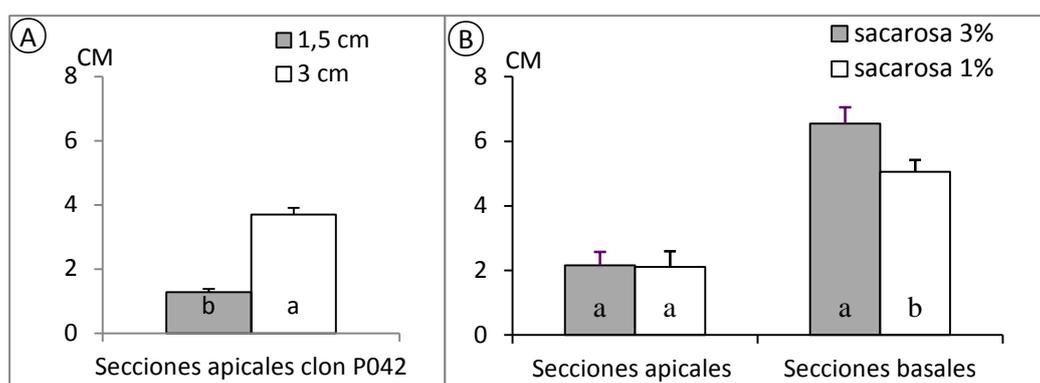


Figura 1. Efecto del tamaño de explanto (A) y la sacarosa (B) en la capacidad de multiplicación (CM) de brotes de castaño cultivados con 400 ppm CO<sub>2</sub>. A) Clon P042: Secciones apicales (1,5 y 3 cm) cultivados bajo 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PPF y con sacarosa 3%. B) Clon P043: Secciones apicales y basales de 3 cm cultivados bajo 150 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PPF y con dos niveles de sacarosa. Para cada clon y tipo de explanto, letras diferentes indican diferencias significativas a p < 0,05.

Con el objetivo de mejorar la proliferación de brotes cultivados con bajas cantidades de azúcar, se estudió el efecto de aplicar aire enriquecido con CO<sub>2</sub> a secciones basales del clon C053 cultivado bajo alto PPF (150 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y con sacarosa 1% (Figura 2a). Aplicando aire enriquecido en CO<sub>2</sub> se obtuvieron más brotes y más largos, lo que produjo coeficientes de multiplicación significativamente más altos. Sin embargo, el aumento de CO<sub>2</sub> no afectó a los niveles de pigmentos fotosintéticos (Figura 2b).

El efecto beneficioso del CO<sub>2</sub> sobre el crecimiento se ha observado también en manzano cultivado con o sin azúcar (MORINI & MELAI 2003/4), kiwi cultivado con 1-2% sacarosa (ARIGITA et al. 2010), así como en *Pfaffia glomerata* (SALDANHA et al. 2013) y *Paulownia fortunei* (SHA VALLI KHAN et al. 2003), ambos cultivados sin azúcar.

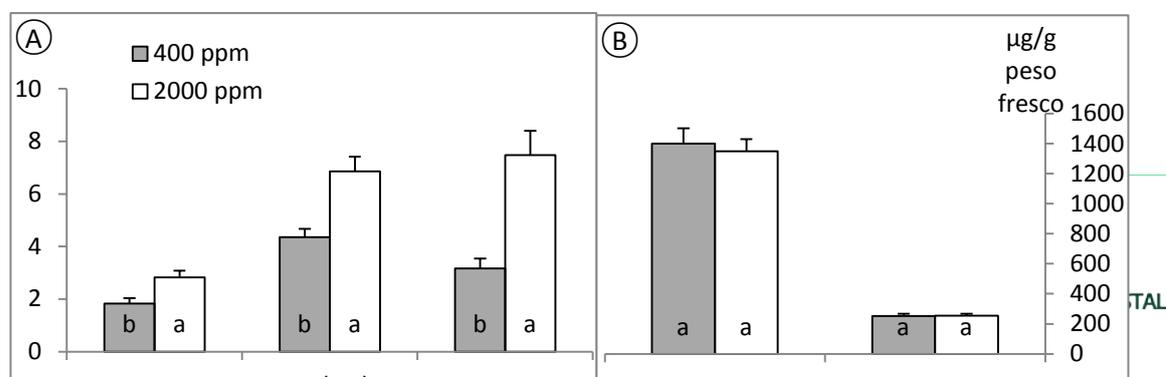


Figura 2. Efecto de los niveles de CO<sub>2</sub> (400 and 2000 ppm) en la proliferación (A) y pigmentos fotosintéticos (B) de secciones basales del clon C053 cultivados con 1% sacarosa y 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPF. Para cada variable, letras diferentes indican diferencias significativas a  $p < 0.05$ .

El efecto de la intensidad lumínica (PPF 50 y 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) se investigó con el mismo genotipo (Figura 3). Aunque los explantos basales cultivados con más luz crecieron mejor, la intensidad de luz no tuvo un efecto significativo en los indicadores estudiados, ya que se obtuvieron valores de P de 0,434, 0,197 y 0,239 para el n° de brotes, de segmentos (CM) y de brotes enraizables, respectivamente, mientras que el tipo de explanto sí tuvo una gran influencia en la proliferación, con P menor de 0,001 para todas las variables.

En *Eucalyptus uro-grandis* y *Doritaenopsis* se observó una situación similar, ya que los brotes pudieron ser propagados sin sacarosa bajo un PPF relativamente bajo (45  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), aunque con suministro de altos niveles de CO<sub>2</sub> (TANAKA et al. 2005; SHIN et al. 2013).

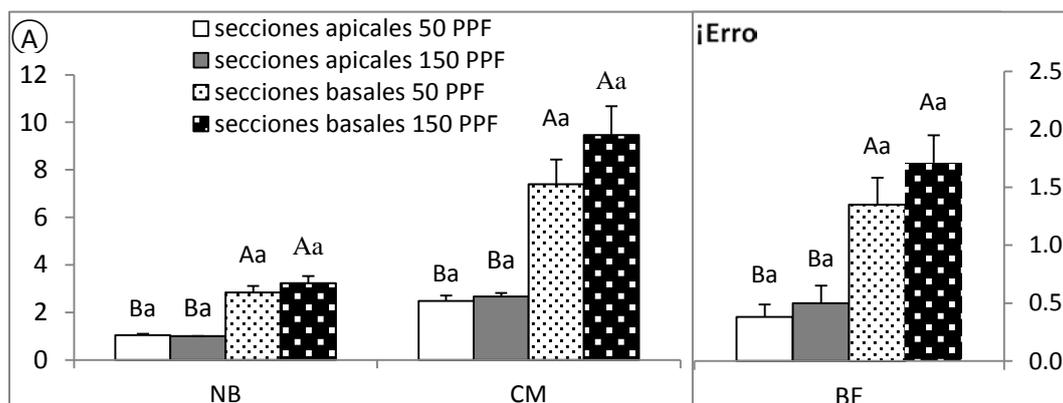


Figura 3. Efecto de la intensidad de luz (PPF de 50 y 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y del tipo de explanto (secciones basales y apicales) en la proliferación (A) y n° de brotes enraizables (B) del clon C053 cultivado con 1% sacarosa y 2000 ppm de CO<sub>2</sub>. Para cada variable, letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas relativas al tipo de explanto, y letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas relativas a la intensidad de luz.  $P < 0.05$ .

Las condiciones que permitieron buenos niveles de crecimiento con sacarosa 1% (2000 ppm CO<sub>2</sub> y 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPF) se aplicaron al cultivo con sacarosa 0,5% durante un mes, tras lo cual los brotes se sembraron en medio sin azúcar. A continuación se muestra el aspecto de brotes de los clones P043, C053 y C042 tras 3 subcultivos en PAM sin azúcar (Figura 4a-c), así como la proliferación de secciones basales y apicales del clon P042 en las mismas condiciones (Figura 4d).



Figura 4. Proliferación de clones de castaño cultivados sin sacarosa bajo  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPF y con 2000 ppm  $\text{CO}_2$ . A) Clon P043. B) Clon C053. C) Clon C042. D) Secciones basales y apicales del clon P042. Para cada variable, valores medios seguidos de la misma letra no presentaron diferencias significativas a  $p < 0.05$ .

Como puede observarse, los brotes de castaño crecieron en condiciones fotoautotróficas sin sacarosa. Se obtuvieron brotes vigorosos con coeficientes de multiplicación medios de 3 y 5 para secciones apicales y basales, respectivamente, aunque en general no fueron tan altos como los obtenidos con azúcar (datos no mostrados). Una situación similar se observó en *Paulownia fortunei* (SHA VALLI KHAN et al. 2003), mientras que en otras plantas como *Samanea saman* (MOSALEEYANON et al. 2004) y *Oplopanax elatum* (PARK et al. 2011) la adición de sacarosa disminuyó la proliferación o la calidad de los brotes. En otros casos, la presencia de azúcar promovió el crecimiento en condiciones PAM, como se ha señalado en *Alocasia amazonica* (JO et al 2009), *Populus deltoides* (MINGOZZI et al. 2009), y *Juglans regia* (HASSANKHAH et al. 2014). En *C. sativa*, SÁEZ et al. (2016) no pudieron obtener proliferación en brotes cultivados bajo 50 o 150 PPF con 0.5% sacarosa. Sin embargo, en ese estudio el descenso en la aportación de azúcar no fue acompañado de un incremento en el aporte de  $\text{CO}_2$ , como recomendaron KOZAI & KUBOTA (2001) para el desarrollo en condiciones fotoautotróficas.

#### Enraizamiento

Para estudiar el efecto del  $\text{CO}_2$  en los porcentajes de enraizamiento se utilizaron más de 6000 brotes pertenecientes a 15 genotipos (Figura 5a). Aunque no se detectaron diferencias significativas, los niveles entre 1200 y 1500 ppm resultaron los más adecuados para el desarrollo de las raíces y el crecimiento de los brotes.

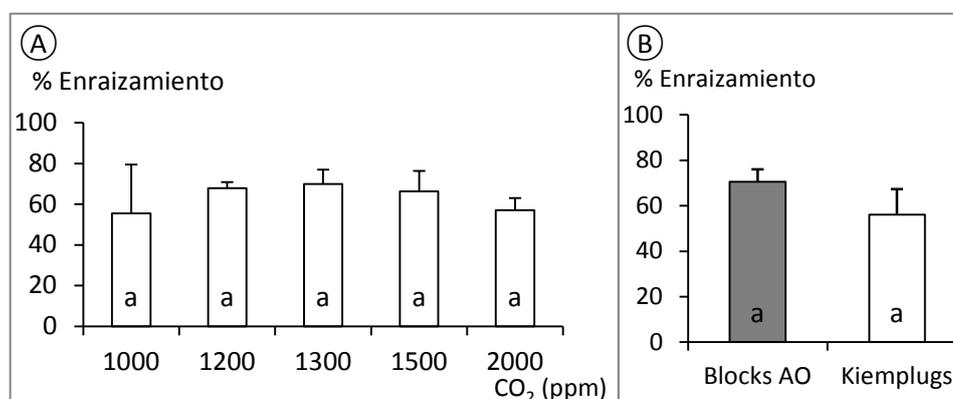


Figura 5. Efecto del aporte de  $\text{CO}_2$  (A), y el tipo de sustrato (B), en el enraizamiento de brotes de castaño. Se usaron explantos de 15 clones (6300 brotes) y el enraizamiento se indujo por inmersión basal en 1g/L AIB durante 2 min antes de su transferencia a bloques de lana de roca (Blocks AO or Kiemplugs) en biorreactores de 16 L con diferentes niveles de  $\text{CO}_2$ . Valores medios seguidos de la misma letra no presentaron diferencias significativas a  $p < 0.05$ .

En cuanto a los soportes para mantener los brotes en posición vertical, tampoco se observaron diferencias significativas, obteniéndose porcentajes de enraizamiento del 71% con los Blocks y del 51% con los Kiemplugs (Figura 5b).

Tras el trasplante a maceta en invernadero se observó una alta tasa de supervivencia, así como re-emprendimiento del crecimiento de los ápices caulinares. Los brotes enraizados en PAM se aclimataron adecuadamente (Figura 6). Se obtuvieron valores medios de enraizamiento y aclimatación del 52%, lo que indica la conveniencia de aplicar las condiciones fotoautotróficas al

enraizamiento de castaño. Se han observado resultados similares en otras especies como *Eucalyptus calmadulensis* (ZOBAYED et al. 2001), *Myrtus communis* (LUCCHESINI et al. 2006), *Populus deltoides* (MINGOZZI et al. 2009), *Macadamia tetraphylla* (CHA-UM et al. 2011) y *Oplonanax elatum* (PARK et al. 2011), en las que el enraizamiento y la aclimatación se vieron favorecidos con la aplicación de condiciones fotoautotróficas.



Figura 6. A) Brotes del clon 90025 enraizados en distintos formatos de lana de roca. B) Plantas aclimatadas de Prêcoce Migoule 2 meses después de la inducción del enraizamiento en condiciones PAM.

## 5. Conclusiones

Se ha obtenido por primera vez la proliferación y enraizamiento de castaño en condiciones fotoautotróficas. Para la proliferación, los brotes tuvieron que someterse a niveles decrecientes de azúcar durante algunos meses antes de que pudieran sobrevivir en medios sin sacarosa. El enraizamiento en condiciones PAM fue efectivo y se obtuvieron buenos porcentajes de aclimatación, lo que indica que el sistema PAM puede aplicarse de modo eficiente a la propagación a gran escala de castaño.

## 6. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente a través del programa FEDER ININTERCONECTA 2013/2014 (proyecto INTEGRACASTANEA EXP00064828/ITC-20133040) apoyado por el CDTI y cofinanciado con fondos FEDER. Los autores agradecen a Maite García, Begoña Pato, Blandina Blanco, Begoña Correa y Anxela Aldrey su asistencia técnica.

## 7. Bibliografía

ARIGITA, L.; CANÁL, J.; TAMÉS, R.S.; GONZÁLEZ, A. 2010. CO<sub>2</sub>-enriched microenvironment affects sucrose and macronutrients absorption and promotes autotrophy in the in vitro culture of kiwi (*Actinidia deliciosa* Chev. Liang and Ferguson). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 46:312–322.

CHA-UM, S.; CHANSEETIS, C.; CHINTAKOVID, W.; PICHAKUM, A.; SUPAIBULWATANA, K. 2011. Promoting root induction and growth of in vitro macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. 'Keaau') plantlets using CO<sub>2</sub>-enriched photoautotrophic conditions. *Plant Cell Tiss Org Cult* 106:435–444.

CUENCA, B.; ALDREY, A.; BLANCO, B.; VIDAL, N. 2015. Use of a Continuous Immersion System (CIS) for micropropagation of chestnut in photoautotrophic and photomixotrophic conditions. En: Park, Y.S. y Bonga. J.M. (eds). *Proceedings of the 3rd international conference of the IUFRO unit 2.09.02 on "Woody plant production integrating genetic and vegetative*

propagation technologies". Página 112-116. Vitoria-Gasteiz, España. Publicado on line: <http://www.iufro20902.org>.

GONZÁLEZ, M.V.; CUENCA, B.; LÓPEZ, M.; PRADO, M.J.; REY, M. 2011. Molecular characterization of chestnut plants selected for putative resistance to *Phytophthora cinnamomi* using SSR markers. *Sci Hortic* 130:459-467.

GRESSHOFF, P.M; DOY, C.H. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. *Planta* 107:161-170.

HASSANKHAH, A.; VAHDATI, K.; LOTFI, M.; MIRMASOUMI, M.; PREECE, J.; ASSAREH, M-H. 2014. Effects of ventilation and sucrose concentrations on the growth and plantlet anatomy of micropropagated Persian walnut plants. *Int J Hortic Sci Technol* 1:111-120.

JO, E-A.; TEWARI, R.K.; HAHN, E-J.; PAEK, K-Y. 2009. In vitro sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 96:307-315.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. 2001. Development a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. *J Plant Res* 114:525-537.

LUCCHESINI, M.; MONTEFORTI, G.; MENSUALI-SODI, A.; SERRA, G. 2006. Leaf ultrastructure, photosynthetic rate and growth of myrtle plantlets under different in vitro culture conditions. *Biol Plant* 50:161-168.

MINGOZZI, M.; MONTELLO, P.; MERKLE, S. 2009. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of eastern cottonwood (*Populus deltoides*) cultured under photoautotrophic conditions. *Tree Physiol* 29:333-343.

MIYASHITA, Y.; KITAYA, Y.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. 1996. Photoautotrophic growth of potato plantlets as affected by explant leaf area, fresh weight and stem length. *Sci Hortic* 65:199-202.

MORINI, S.; MELAI, M. 2003/4. CO<sub>2</sub> dynamics and growth in photoautotrophic and photomixotrophic apple cultures. *Biol. Plant.* 47: 167-172.

MOSALEEYANON, K.; CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. 2004. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets in vitro under a CO<sub>2</sub>-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. *Sci. Hortic.* 103:51-63.

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

PARK, S.Y.; MOON, H.K.; MURTHY, H.N.; KIM, Y.W. 2011. Improved growth and acclimatization of somatic embryo-derived *Oplomanax elatus* plantlets by ventilated photoautotrophic culture. *Biol Plant* 55:559-562.

PIERIK, R.L.M. 1987. The influence of plant material on growth and development. En: *In Vitro Culture of Higher Plants*. Pagina 107-114. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.



SÁEZ, P.L.; BRAVO, L.A.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; BRAVO, P.B.; RÍOS, D.G. 2016. Effect of photon flux density and exogenous sucrose on the photosynthetic performance during in vitro culture of *Castanea sativa*. *Am J Plant Sci* 7:2087-2105.

SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; NOTINI, M.M.; KUKI, K.N.; CRUZ, A.C.F.; RUBIO NETO, A.; DIAS, L.L.C.; OTONI, W.C. 2013. A CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere improves in vitro growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 49:433-444.

SHA VALLI KHAN, P.S.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q.T.; KUBOTA, C.; VIBHA, D. 2003. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. *Biol. Plant.* 46 (2), 161-166.

SHIN, K.S.; PARK, S.Y.; PAEK, K.Y. 2013. Sugar metabolism, photosynthesis, and growth of in vitro plantlets of *Doritaenopsis* under controlled microenvironmental conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 49:445-454.

TANAKA, M.; GIANG, D.T.T.; MURAKAMI, A. 2005. Application of a novel disposable film culture system to photoautotrophic micropropagation of *Eucalyptus uro-grandis* (*urophylla* x *grandis*). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41, 173-180.

VIDAL, N.; BLANCO, B.; CUENCA, B. 2015. A Temporary Immersion System for Micropropagation of Axillary Shoots of Hybrid Chestnut. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 123:229-243.

VIEITEZ, A.M.; SÁNCHEZ, M.C.; GARCÍA-NIMO, M.L.; BALLESTER, A. 2007. Protocol for micropropagation of *Castanea sativa* Mill. En: Jain, S.M.; Häggman, H. (eds): *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. Página 299-312. Springer, Heidelberg.

WELLBURN, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.*, 144:307-313.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. 2011. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 105:149-158.

YOON, Y.J.; MOBIN, M.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. 2009. Impact of in vitro CO<sub>2</sub> enrichment and sugar deprivation on acclimatory responses of *Phalaenopsis* plantlets to ex vitro conditions. *Environ. Exp. Bot.* 65:183-188.

ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. 2001. Physiology of *Eucalyptus* plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:807-813.

