



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TESIS

**DESARROLLO DE TÉCNICAS PARA EL CULTIVO Y
PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE ESPECIES DE ENCINO (*Quercus spp*)
NATIVAS DE AGUASCALIENTES.**

PRESENTA

Biol. José Silvestre Delgadillo Díaz de León

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTOR

Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch

COMITÉ TUTORAL

Dr. José Francisco Morales Domínguez

Dra. María del Socorro Carmen Santos Díaz (UASLP)

Aguascalientes, Ags.

Febrero del 2013.

M. en C. José de Jesús Ruíz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas
P R E S E N T E:

Estimado M. en C. Ruíz Gallegos:

Por este medio le comunico que el Biol. José Silvestre Delgadillo Díaz de León, egresado del Doctorado en Ciencias Biológicas en su modalidad de Doctorado Directo, ha concluido satisfactoriamente tanto su trabajo de tesis, como el escrito derivado del mismo. El título de su proyecto fue: "DESARROLLO DE TÉCNICAS PARA EL CULTIVO Y PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE ESPECIES DE ENCINO (*Quercus* spp.) NATIVAS DE AGUASCALIENTES".

Asimismo, le informo que después de revisar el escrito, así como las correcciones hechas al mismo, considero que ya se tiene una versión final satisfactoria y se puede proceder a su impresión definitiva y al examen de grado. Cabe mencionar que ya se tiene un artículo científico derivado de este trabajo aceptado en una revista incluida en el Índice de Revistas Mexicanas de Investigación del CONACYT.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags., a 31 de enero de 2013



Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch
Tutor de Tesis
Departamento de Química
Centro de Ciencias Básicas

M. en C. José de Jesús Ruíz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas
P R E S E N T E:

Estimado M. en C. Ruíz Gallegos:

Por este medio le comunico que el **Biol. José Silvestre Delgadillo Díaz de León**, egresado del Doctorado en Ciencias Biológicas en su modalidad de Doctorado Directo, ha concluido satisfactoriamente tanto su trabajo de tesis, como el escrito derivado del mismo. El título de su proyecto fue: "DESARROLLO DE TÉCNICAS PARA EL CULTIVO Y PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE ESPECIES DE ENCINO (*Quercus* spp.) NATIVAS DE AGUASCALIENTES".

Asimismo, le informo que después de revisar el escrito, así como las correcciones hechas al mismo, considero que ya se tiene una versión final satisfactoria y se puede proceder a su impresión definitiva y al examen de grado. Cabe mencionar que ya se tiene un artículo científico derivado de este trabajo aceptado en una revista incluida en el Índice de Revistas Mexicanas de Investigación del CONACYT.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"
Aguascalientes, Ags., a 1 de Febrero de 2013



Dr. José Francisco Morales Domínguez
Asesor de Tesis
Departamento de Química
Centro de Ciencias Básicas



San Luis Potosí, 1 de febrero de 2013

M. en C. José de Jesús Ruíz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas

PRESENTE

Estimado M. en C. Ruíz Gallegos:

Por este medio le comunico que el Biol. José Silvestre Delgadillo Díaz de León, egresado del Doctorado en Ciencias Biológicas en su modalidad de Doctorado Directo, ha concluido satisfactoriamente su trabajo de tesis y el escrito derivado del mismo. El título de su proyecto fue: "DESARROLLO DE TÉCNICAS PARA EL CULTIVO Y PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE ESPECIES DE ENCINO (*Quercus* spp.) NATIVAS DE AGUASCALIENTES".

Asimismo, le informo que después de revisar el escrito, considero que ya tiene una versión final satisfactoria y se puede proceder a su impresión definitiva y al examen de grado. Cabe mencionar que ya fue aceptado un artículo científico derivado de este trabajo en una revista incluida en el Índice de Revistas Mexicanas de Investigación del CONACYT.

ATENTAMENTE

Dra. Maria del Socorro Santos Díaz

Investigador de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

BIOL. JOSÉ SILVESTRE DELGADILLO DÍAZ DE LEÓN
ALUMNO (A) DEL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E .

Estimado (a) alumno (a) Delgadillo:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "Desarrollo de Técnicas para el cultivo y Propagación *in vitro* de especies de encino (*Quercus spp.*) nativas de Aguascalientes", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE
Aguascalientes, Ags., 5 de febrero de 2013.
"SE LUMEN PROFERRE"
EL DECANO SUSTITUTO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



c.c.p.- Archivo
JJRG,mjda

POLIBOTÁNICA

17. Diciembre. 2012

JOSÉ SILVESTRE DELGADILLO-DÍAZ DE LEÓN

Departamento de Química
Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes
México.

PRESENTE

Por medio de este conducto me permito comunicar a usted que su artículo: "**IN VITRO PROPAGATION OF MEXICAN OAKS (*Quercus* spp.)**", teniendo como co-autores a **JOSÉ FRANCISCO MORALES-DOMÍNGUEZ, MARÍA DEL SOCORRO SANTOS-DÍAZ** y **EUGENIO PÉREZ-MOLPHE-BALCH**, ha sido revisado por parte de nuestros árbitros y estos opinan que el trabajo esta bien estructurado y es una aportación importante, por lo tanto el artículo arriba mencionado se acepta para su publicación en el No. 35 de *POLIBOTÁNICA* que saldrá en el primer trimestre del 2013.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,



Dr. Rafael Fernández Nava,
Editor en Jefe de *POLIBOTÁNICA*

POLIBOTÁNICA



IPN

Departamento de Botánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Instituto Politécnico Nacional, Apartado Postal 17-564, CP 11410, México, DF.

AGRADECIMIENTOS

Escribir los agradecimientos de la Tesis, es una de las tareas más agradables, porque significa su culminación. Al pasar el tiempo, mi percepción sobre los encinos habrá cambiado, pero siempre estaré seguro de este capítulo.

El primer agradecimiento quisiera hacerlo de manera muy especial a mi director de Tesis el Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch, que me mostró su confianza personal a lo largo de los últimos años, por sus valiosas enseñanzas, por su inestimable ayuda, disponibilidad, interés, motivación y paciencia conmigo, para sacar adelante este proyecto.

Asimismo, agradezco el apoyo y la colaboración de los miembros del comité tutorial. A la Dra. María del Socorro Carmen Santos Díaz y el Dr. J. Francisco Morales Domínguez por las atinadas observaciones hechas en este trabajo,

A Martha Pérez, le agradezco su disposición y ayuda en todo momento.

A Mayra Esparza por su gran ayuda y colaboración al iniciar este proyecto.

A Guadalupe Mata, por su gran compañía en el campo y su bonita amistad.

A mis compañeros del doctorado y de laboratorio por compartir grandes vivencias por todos los momentos de convivencia, que hacen más agradable el trabajo diario.

A Carlos Dávila Figueroa por todo su apoyo y por su inestimable amistad.

Al personal del Herbario y Jardín Botánico, del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes por la información proporcionada. En especial a la Maestra Margarita de la Cerda y el Maestro Octavio Rosales.

Al personal del IMAE, por la ayuda recibida en las visitas a las diferentes localidades.

Al CONACyT por la beca que me otorgó para la realización de mis estudios de Doctorado.

A la Fundación Carlos Slim, por haber confiado en mí, brindándome una beca.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por permitirme formarme mediante este doctorado.

A mi familia, por su apoyo incondicional en todo lo que he emprendido.

Especialmente a Dios por permitirme llegar a esta gran etapa de mi vida, por darme la fuerza y animo en momentos difíciles y porque ha hecho posible que yo sea capaz de realizar mis objetivos en la vida.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



Dedicado a mis padres Felipa y Manuel y a todos mis hermanos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUCCIÓN	3
1.1 Ggeneralidades sobre los encinos	3
1.2 El género <i>quercus</i> en el Estado de Aguascalientes.....	5
1.3 Características de las especies estudiadas.....	7
1.4 Cultivo de tejidos vegetales del género <i>Quercus</i>	24
2. OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivos generales.....	35
2.2 Objetivos específicos	35
3. METODOLOGÍA.....	39
3.1 Colecta del material vegetal de las especies a trabajar	39
3.2 Inducción y multiplicación de brotes a partir del nudo cotiledonar	39
3.3 Obtención de brotes a partir de yemas axilares	40
3.4 Enraizamiento de los brotes generados a partir de yemas axilares y del nudo cotiledonar	41
3.5 Embriogénesis somática	42
3.6 Adaptación a condiciones de invernadero de las plantas generadas a través del nudo cotiledonar, yemas axilares y de la embriogénesis somática.....	45
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1 Respuesta del nudo cotiledonar	49
4.2 Respuesta de yemas axilares y apicales.....	55
4.3 Enraizamiento de brotes.....	63
4.4 Embriogénesis somática	72

4.5 Adaptación a condiciones de invernadero de las plantas generadas del enraizamiento de brotes obtenidos del nudo cotiledonar y yemas axilares, así como de la embriogénesis somática..... 83

5. CONCLUSIONES..... 89

6. BIBLIOGRAFÍA..... 95

ANEXO A..... 103

ANEXO B..... 105



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Efecto de la BA o CIN sobre la formación y longitud de los brotes de <i>Q. castanea</i> a partir de NC.	50
Cuadro 2. Efecto de la BA o CIN sobre la formación y longitud de los brotes de <i>Q. eduardii</i> a partir de NC.	50
Cuadro 3. Efecto de la BA o CIN sobre la formación y longitud de los brotes de <i>Q. resinosa</i> a partir de NC.	51
Cuadro 4. Efecto de la BA o CIN sobre la formación y longitud de los brotes de <i>Q. rugosa</i> a partir de NC.	51
Cuadro 5. Efecto de la BA, CIN, o 2iP sobre la respuesta de yemas axilares de <i>Q. castanea</i>	55
Cuadro 6. Efecto de la BA, CIN, o 2iP sobre la respuesta de yemas axilares de <i>Q. chihuahuensis</i>	56
Cuadro 7. Efecto de la BA, CIN, o 2iP sobre la respuesta de yemas axilares de <i>Q. eduardii</i>	56
Cuadro 8. Efecto de la BA, CIN, o 2iP sobre la respuesta de yemas axilares de <i>Q. grisea</i>	57
Cuadro 9. Efecto de la BA, CIN, o 2iP sobre la respuesta de yemas axilares de <i>Q. laeta</i>	57
Cuadro 10. Efecto de la BA, CIN, o 2iP sobre la respuesta de yemas axilares de <i>Q. potosina</i>	58
Cuadro 11. Efecto de la BA, CIN, o 2iP sobre la respuesta de yemas axilares de <i>Q. resinosa</i>	58
Cuadro 12. Efecto de la BA, CIN, o 2iP sobre la respuesta de yemas axilares de <i>Q. rugosa</i>	59
Cuadro 13. Efecto de la concentración de AIB (mg.L ⁻¹) y el periodo de aplicación (días), sobre el porcentaje de enraizamiento, número de raíces y longitud de la raíz de <i>Q. castanea</i>	63

Cuadro 14. Efecto de la concentración de AIB (mg.L^{-1}) y el periodo de aplicación (días), sobre el porcentaje de enraizamiento, número de raíces y longitud de la raíz de *Q. eduardii*. **64**

Cuadro 15 Efecto de la concentración de AIB (mg.L^{-1}) y el periodo de aplicación (días), sobre el porcentaje de enraizamiento, número de raíces y longitud de la raíz de *Q. resinosa*. **65**

Cuadro 16. Efecto de la concentración de AIB (mg.L^{-1}) y el periodo de aplicación (días), sobre el porcentaje de enraizamiento, número de raíces y longitud de la raíz de *Q. rugosa*. **66**

Cuadro 17. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre la inducción de la embriogénesis somática en semillas de *Q. castanea*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa* y *Q. rugosa*. **75**

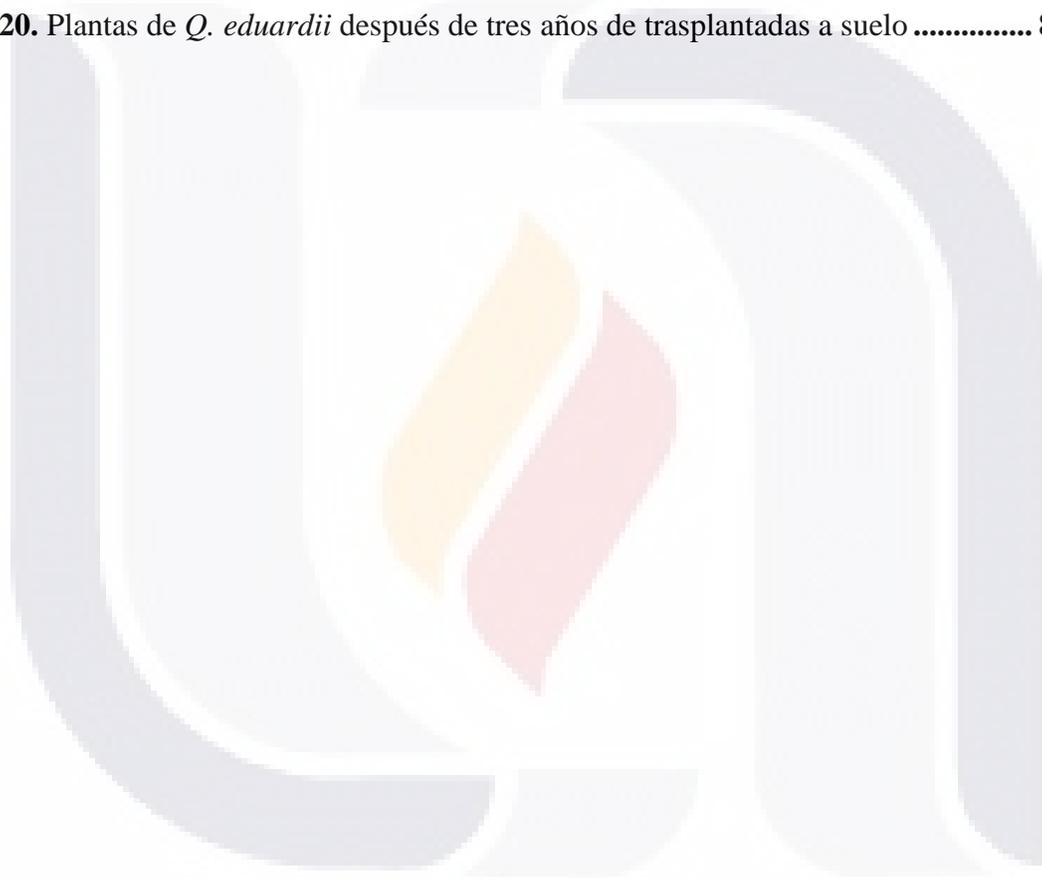
Cuadro 18. Porcentajes de aclimatación para cada especie **86**

Cuadro 19. Vías de regeneración que se utilizó para cada especie. **86**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localidades con presencia de encinos.....	6
Figura 2. Zonas montañosas con presencia del género <i>Quercus</i> en Aguascalientes	6
Figura 3. Propagación in vitro por medio de la inducción de brotes a partir del NC	53
Figura 4. Respuesta del NC para las especies <i>Q. chihuahuensis</i> , <i>Q. coccolobifolia</i> , <i>Q. gentryi</i> , <i>Q. grisea</i> , <i>Q. laeta</i> , <i>Q. potosina</i> , <i>Q. praeco</i> , y <i>Q. sideroxyla</i> , en medio MS con 3.0 mg.L ⁻¹ de BA	54
Figura 5. Respuesta de yemas axilares de explantes obtenidos de árboles adultos de las especies <i>Q. depressipes</i> , <i>Q. eduardii</i> , <i>Q. microphylla</i> , y <i>Q. repanda</i> , en medio MS con 3.0 mg.L ⁻¹ de BA	60
Figura 6. Brotes de yemas axilares	62
Figura 7. Enraizamiento de brotes obtenidos del NC de las especies <i>Q. chihuahuensis</i> , <i>Q. coccolobifolia</i> , <i>Q. gentryi</i> , <i>Q. grisea</i> , <i>Q. laeta</i> , <i>Q. potosina</i> , <i>Q. praeco</i> , y <i>Q. sideroxyla</i> , medio MS con 10.0 mg.L ⁻¹ de AIB	68
Figura 8. Enraizamiento de brotes obtenidos las yemas axilares de explantes provenientes del NC, en el medio MS con 10.0 mg.L ⁻¹ de AIB de las especies: <i>Q. castanea</i> , <i>Q. chihuahuensis</i> , <i>Q. eduardii</i> , <i>Q. grisea</i> , <i>Q. laeta</i> , <i>Q. potosina</i> , <i>Q. resinosa</i> , y <i>Q. rugosa</i>	69
Figura 9. Enraizamiento de brotes obtenidos de yemas axilares de explantes obtenidos de árboles adultos en el medio MS con 10.0 mg.L ⁻¹ de AIB de las especies <i>Q. depressipes</i> , <i>Q. eduardii</i> , <i>Q. microphylla</i> , y <i>Q. repanda</i>	70
Figura 10. Enraizamiento de brotes con 10 mg.L ⁻¹ IBA.....	71
Figura 11. ES en diferentes etapas del desarrollo.....	73
Figura 12. Etapas del desarrollo de ES.....	74
Figura 13. Inducción de embriogénesis somática en entrenudos y hojas	77
Figura 14. Porcentaje de explantes que formaron ES de <i>Q. depressipes</i> , <i>Q. eduardii</i> , <i>Q. resinosa</i> y <i>Q. rugosa</i>	78
Figura 15. Eventos en la embriogénesis somática	79

Figura 16. Embriones germinados	81
Figura 17. Porcentaje de embriones somáticos que germinaron de <i>Q. castanea</i> , <i>Q. eduardii</i> , <i>Q. resinosa</i> y <i>Q. rugosa</i>	82
Figura 18. Plántulas trasplantadas a sustrato para su aclimatación. Provenientes del NC..	84
Figura 19. Plántulas obtenidas de ES, trasplantadas a sustrato para su aclimatación	85
Figura 20. Plantas de <i>Q. eduardii</i> después de tres años de trasplantadas a suelo	85



RESUMEN

Las especies de *Quercus* (encinos) se encuentran en los bosques templados del Hemisferio Norte. México es considerado como centro de diversificación del género y muchas especies son endémicas del país. El género *Quercus* es uno de los más importantes desde el punto de vista forestal. Sin embargo, su manejo resulta muy complicado debido a que sus semillas son recalcitrantes, por lo que no pueden ser almacenadas. Además, el período juvenil es muy extenso, Por todo lo anterior, la propagación masiva de esta especie a través de métodos biotecnológicos, como el cultivo de tejidos vegetales resulta muy atractiva. En este trabajo se realizó un escrutinio con las especies de encino nativas del estado de Aguascalientes con el fin de determinar cuáles eran susceptibles de ser propagadas *in vitro*. Se obtuvieron múltiples brotes de *Q. castanea*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa* y *Q. rugosa*, a partir del NC de embriones cigóticos germinados, cultivados en el medio MS complementado con BA, o CIN, así como brotes de *Q. chihuahuensis*, *Q. coccolobifolia*, *Q. gentryi*, *Q. grisea*, *Q. laeta*, *Q. potosina*, *Q. praeco* y *Q. sideroxylla*, en el medio MS complementado con BA. Brotes de *Q. castanea*, *Q. chihuahuensis*, *Q. eduardii*, *Q. grisea*, *Q. laeta*, *Q. potosina*, *Q. resinosa*, y *Q. rugosa*, se indujeron a partir yemas axilares, de segmentos nodales obtenidos de los brotes provenientes del NC, cultivados en el medio MS complementado con BA, CIN y 2iP. También se obtuvieron brotes a partir yemas axilares de segmentos nodales obtenidos de ramas provenientes árboles adultos de *Q. depressipes*, *Q. eduardii*, *Q. microphylla* y *Q. repanda*, cultivados en el medio MS complementado con BA. Los brotes regenerados se enraizaron en el mismo medio pero diluido, complementado con AIB. La inducción de la embriogénesis somática se logró en embriones cigóticos inmaduros en las especies examinadas: *Q. castanea*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa* y *Q. rugosa*, en el medio MS complementado combinaciones de BA con ANA o 2,4-D, o BA o 2iP solos. Además la embriogénesis somática se alcanzó en explantes de internodo y hoja, de *Q. depressipes*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa* y *Q. rugosa*. Los ES se maduraron en un medio MS con sacarosa al 5%, logrando la germinación después de la desecación por aeración, y el cultivo en el medio con carbón activado al 0.5%. Se logró la adaptación a las condiciones de invernadero de las plántulas de todas las especies estudiadas, además del establecimiento de plantas de *Q. eduardii* a condiciones de campo.

ABSTRACT

The *Quercus* species (oaks) are found in the temperate forests of the Northern Hemisphere. Mexico is considered as center of diversification of the genus and many species are endemic to the country. The genus *Quercus* is one of the most important from the viewpoint of forest. However, handling becomes very difficult due to their recalcitrant seeds therefore cannot be stored. In addition, the juvenile period is very long, Therefore, the mass propagation of this species through biotechnological methods, as plant tissue culture is very attractive. In this work, was scrutiny with the native oak species to the state of Aguascalientes in order to determine which were capable of being propagated *in vitro*. Multiple shoots were obtained from *Q. castanea*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa* and *Q rugosa* from NC of germinated zygotic embryos, cultured on MS medium supplemented with BA, or CIN, and shoots from *Q. chihuahuensis*, *Q. coccolobifolia*, *Q. gentryi*, *Q. grisea*, *Q. laeta*, *Q. potosina*, *Q. praeco* and *Q. sideroxyla*, on MS medium supplemented with BA. Shoots of *Q. castanea*, *Q. chihuahuensis*, *Q. eduardii*, *Q. grisea*, *Q. laeta*, *Q. Potosina*, *Q. resinosa*, and *Q. rugosa*, were induced from axillary buds of nodal segments obtained from NC cultured on MS medium supplemented with BA, CIN and 2iP. Shoots were obtained from axillary buds of nodal segments obtained of branches from mature trees of *Q. depressipes*, *Q. eduardii*, *Q. microphylla* and *Q. repanda* grown on MS medium supplemented with BA. Regenerated shoots were rooted on the MS medium diluted, supplemented with IBA. The induction of somatic embryogenesis was achieved in immature zygotic embryos form species examined: *Q. castanea*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa* *Q rugosa*, on MS medium supplemented with BA combinations NAA or 2,4-D, and BA or 2iP alone. Furthermore, somatic embryogenesis was achieved from internode and leaf explants of *Q. depressipes*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa* *Q rugosa*. The ES matured on MS medium with 5% sucrose, achieving germination after drying by aeration, and culturing in medium with 0.5% activated charcoal. It was possible to adapt seedlings to greenhouse conditions for all species studied, as well as adaptation from plants of *Q. eduardii* to field conditions.

1

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES SOBRE LOS ENCINOS

En la familia Fagaceae el género *Quercus* es el que presenta mayor distribución en todo el mundo. Se encuentra en casi todos los bosques templados del Hemisferio Norte, así como en algunas regiones tropicales y subtropicales del mismo. Incluso existen algunas especies en hábitats más secos, en el sureste de Asia y nororiente de África. En América se localiza desde Canadá hasta Colombia, incluyendo Cuba (Valencia 2004).

Se reconocen dos centros de diversidad para el género. El primero se localiza en el sureste de Asia con alrededor de 125 especies. El segundo se presenta en México, particularmente en las regiones montañosas, en donde forman parte importante de los bosques templados. México es considerado como centro de diversificación del género, ya que de las 450 especies estimadas a nivel mundial, entre 135 y 150 especies se encuentran en nuestro país, y de ellas alrededor de 86 se consideran endémicas (Zavala, 1998). De las aproximadamente 140 especies mexicanas, 46% son del subgénero *Lepidobalanus*, 51% de *Erythrobalanus* y 3 % de *Protobalanus* (Zavala 1998).

En México las especies de *Quercus* constituyen el principal componente fisonómico de los bosques de encino, pino-encino y mesófilo de montaña. Los encinos, junto con los pinares constituyen la mayor parte de la cubierta vegetal de las áreas de clima templado y semihúmedo. También se distribuyen en regiones de clima caliente, húmedo y semiárido, en esas últimas en forma de matorrales, presentando en su composición florística una mezcla de elementos neotropicales y holárticos (en porcentajes más o menos equivalentes) y con una participación un poco menos significativa de géneros autóctonos (Rzedowski 1978). Como arbustos forman parte de diversos matorrales y como árboles conforman comunidades vegetales características de las zonas montañosas de México (Zavala 1998). Se distribuyen como masas puras o más frecuentemente mezclados con diversas especies de pinos con los cuales comparten afinidades ecológicas, pueden además encontrarse con *Cupressus* o *Juniperus* (De la Cerda 1999).

Se conocen encinares en todos los estados y territorios de la república, con excepción de Yucatán (Rzedowski 1978), desde el nivel del mar (*Q. oleoides*) (Montoya 1966) hasta arriba de los 3 500 msnm (*Q. frutex*, *Q. laurina*) (Zavala 1990). Sin embargo, más del 95 % de las especies mexicanas se encuentran entre los 1 200 y 2 800 msnm (Rzedowski 1978).

El número de especies de encinos de México varía en las entidades del país de acuerdo a la ubicación geográfica, habiendo mayor riqueza en la región central. De manera semejante, la concentración de especies de los subgéneros *Erythrobalanus* y *Lepidobalanus* es diferente entre entidades. El subgénero de *Lepidobalanus* es mayor en las entidades del norte (porción del país más seca) y *Erythrobalanus* en los estados del sur (porción más húmeda) (Zavala 1998). Los estados más diversos para el género en orden decreciente son Oaxaca, Nuevo León, Jalisco, Chihuahua y Veracruz (Valencia 2004).

Las modificaciones en la distribución de los encinos podrían acentuarse debido al deterioro ambiental causado por cambios en el uso del suelo, incendios y principalmente por sobreexplotación de recursos forestales. En particular, los bosques de pino y encino están gravemente amenazados (Zavala 1998).

Recientemente ha crecido el interés por estudiar los encinos del país (Zavala 1990). Como resultado de su variabilidad se han descrito más especies de las que parece haber realmente. Hay demasiados nombres de especies de encinos, particularmente para las especies mexicanas, aumentando la lista de sinonimias y otros permanecen en duda para incorporarlos a la relación de especies aceptadas en la literatura taxonómica del género (Zavala 1998).

Los encinos en México resaltan su uso maderable debido a sus propiedades físicas, mecánicas y anatómicas. La madera de encino se usa en la elaboración de recipientes culinarios, pisos, postes, durmientes, chapa, embarcaciones, muebles, mangos para herramientas y partes de instrumentos musicales entre otros (Reyes 1995; De la Paz Pérez *et al.* 2000). A nivel nacional la madera de encino ocupa el segundo lugar de

aprovechamiento y los usos a los que se les destina principalmente son; celulosa (54%), escuadría (30%) leña (7%) y carbón (6%) (De la Paz Pérez *et al.* 2000). Sin embargo, los encinos también tienen aplicación como recursos forestales no leñosos, los cuales se usan con fines de alimentación, medicinal y artesanal, entre otros. Los productos forestales no leñosos se refieren a los “bienes de origen biológico diferentes de la madera, derivados de bosques, terrenos arbolados y árboles situados fuera de los bosques” y comprenden específicamente productos provenientes de raíces, tallos, corteza, hojas, agallas, flores y frutos. Dicha definición excluye, el uso de madera, astillas, carbón y leña, así como herramientas, utensilios pequeños y figuras elaboradas de madera. Los encinos son un recurso importante para las comunidades rurales ya que éstas aprovechan prácticamente cada estructura de la planta con diferentes fines como alimento, forraje, usos medicinales y artesanales, fuente de taninos y colorantes (Luna *et al.* 2003).

1.2 EL GÉNERO *Quercus* EN EL ESTADO DE AGUASCALIENTES

En el Estado de Aguascalientes, las áreas ocupadas por encinos están localizadas principalmente en las prolongaciones de la Sierra Fría de Zacatecas, en la parte norte y noroeste del estado. No son bosques puros de encinos, sino que se encuentra asociados a *Pinus*, *Juniperus* y escasamente a *Cupressus* (De la Cerda 1999), esta es la zona boscosa mejor conservada de la entidad. Por el grado de altitud se divide en tres sierras, hacia el norte y noreste de la Sierra Fría, San Blas de Pabellón y Guajolotes, hacia el sureste toma el nombre de Sierra del Pinal, en donde se encuentran estos elementos formando comunidades puras o mezcladas con diferentes especies de pinos (Fig. 1). Más hacia el sur se encuentra la Sierra del Laurel, en donde los encinos se encuentran en forma de manchones algunas veces en ecotonía con el matorral subtropical que predomina en el municipio de Calvillo. Por otro lado, en el extremo noreste del estado de Aguascalientes, en la Sierra de Tepezalá, se pueden observar restos de encinos en donde seguramente existió una zona boscosa ahora ocupada por vegetación secundaria constituida por diversos tipos de matorrales, lo mismo sucede en el municipio de El Llano, en el cerro de Juan el Grande, y en el municipio de Aguascalientes en los cerros del Picacho y los Gallos (Figura 2). Los encinos se encuentran

en altitudes que varían de los 1,800 msnm como en el municipio de Calvillo hasta los 2,900 m en el municipio de San José de Gracia (De la Cerda 1999).



Figura 1. Localidades con presencia de encinos. A) El Pilar. B) Cañón de Hijolotes. C) El Aldeano D) Barranca Verde.

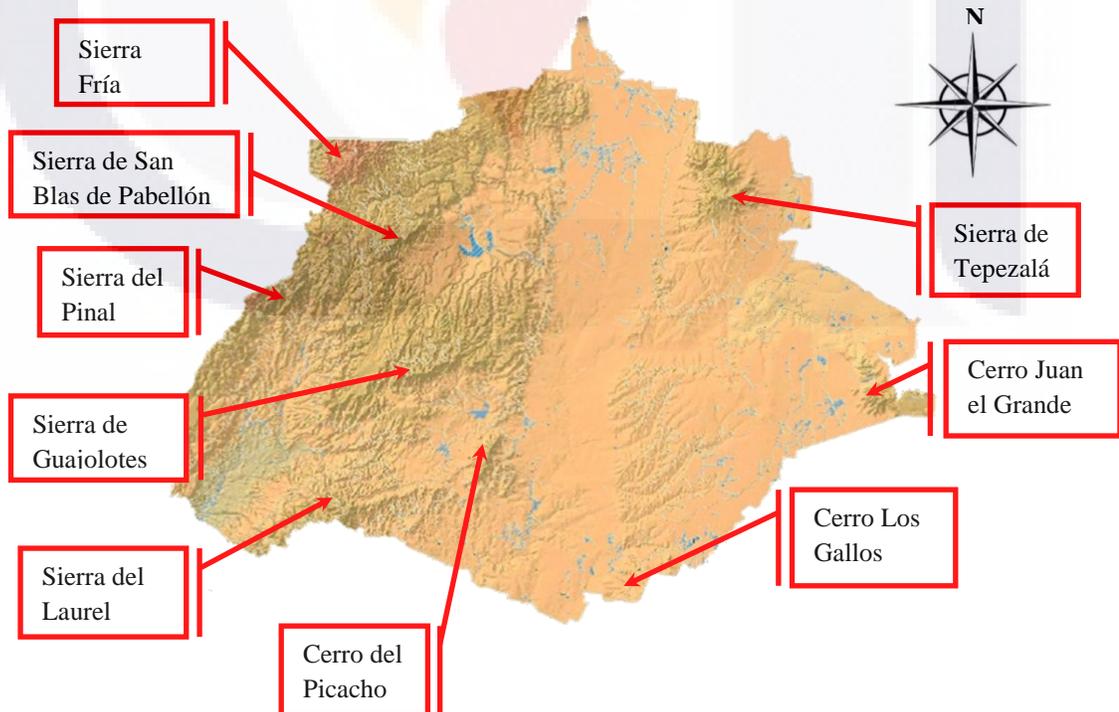


Figura 2. Zonas montañosas con presencia del género *Quercus* en Aguascalientes (INEGI 2011).

1.3 CARACTERÍSTICAS DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS

Características de la Familia Fagaceae

Comprende árboles o arbustos monoicos, yemas con escamas imbricadas, hojas pecioladas alternas, persistentes o deciduas penninervias enteras o dentadas a profundamente pinatífidas con estípulas generalmente deciduas, flores axilares, apétalas, el perianto 4 a 7 lobado; en los amentos de las flores estaminadas, cada bráctea encierra una sola flor, estambres tantos como los lóbulos de la corola o el doble, filamentos delgados anteras con dehiscencia longitudinal; flores pistiladas solitarias o formando espigas cortas, ovario ínfero con tres a seis lóculos, tres estilos en cada lóculo con tres óvulos, uno de ellos abortivo, fruto una nuez o de dos a tres semillas, parcialmente incluida en una copa, semillas sin endospermo (De la Cerda, 1999). Esta familia comprende seis géneros y de 600 a 900 especies ampliamente distribuidas en ambos hemisferios, especialmente en regiones templadas y subtropicales, rara vez en áreas tropicales. En México representada por especies nativas de *Quercus* (encinos) y *Fagus* (haya), incluye también del viejo mundo los castaños *Castanea sativa* ocasionalmente cultivada (De la Cerda 1999).

Características del Género *Quercus* L.

Comprende arbustos o árboles con ramillas más o menos acanaladas, yemas aglomeradas en la extremidad de las ramillas con estípulas asociadas con las yemas, caedizas o persistentes, hojas alternas pecioladas enteras dentadas o lobadas, flores apétalas, las estaminadas en amentos, el cáliz de cinco lóbulos fusionados constituyendo un perianto, con cinco a diez estambres libres de filamentos delgados y anteras cortas, las flores pistiladas en un corto amento, el cáliz de seis lóbulos adheridos a la base de los estilos y fusionados en un tubo, ovario tricarpelar, trilocular con dos óvulos en cada lóculo, estilos 3 libres, fruto con una semilla por atrofia de las otras cinco, las cuales quedan adheridas a él, éste colocado en un involucre escamoso (De la Cerda 1999).

Se les conoce en el estado como roble a los árboles de hoja grande, y encino a los de

hoja pequeña que son la mayoría aunque algunas veces son confundidos los nombres, denominándolos encino-roble. Su identificación se basa principalmente en características foliares como son forma, tipo de base, borde, ápice, número de nervaduras, tipo y cantidad de pubescencia, además de características de la corteza, fruto, porte del encino, si es caducifolio y perennifolio, etcétera (De la Cerda 1999).

Descripción de las especies de encinos estudiadas

En México solo se encuentra el subgénero *Quercus*, de los dos que existen (*Cyclobalanopsis* y *Quercus*), con tres secciones: *Quercus* (encinos blancos) con 81 especies, *Lobatae* (encinos rojos) con 76 especies y *Protobalanus* (encinos intermedios) con cuatro especies (Valencia 2004). En Aguascalientes se encuentra la sección *Quercus* y *Lobatae*.

***Quercus (Lobatae) castanea* Née., 1801**

Sinónimos: *Q. pulchella*, *Q. circummontana*, *Q. rossii*, *Q. serrulata*.

Árbol de 10 a 15 m de alto, pudiendo alcanzar hasta 20 m en condiciones favorables, tronco de 30 a 60 cm hasta 1 m de diámetro; ramillas de 1 a 2 mm de grueso, café tomentosas cuando jóvenes, después glabras o casi glabras, de color café rojizo a negro con muchas lenticelas de 0.5 al mm de longitud; yemas 2.5 a 4 mm de longitud, ovoides, cuatro a cinco anguladas, agudas, con escamas cortamente ciliadas; estípulas 4 a 6 mm de longitud, lanceoladas; hojas cuando jóvenes densamente pálido tomentosas en el envés, verdes o rojizas y poco pubescentes en el haz; hojas maduras pálido a casi blancas en el envés, rígidas y coriáceas, oblanceoladas, variando a elíptico-oblongas, lanceoladas a obovadas, de 3.5 a 11 cm de longitud, de 1.2 a 7.5 cm de ancho, de estrechamente agudas a redondeadas en el ápice, cordadas, subcordadas a redondeadas en la base; margen plano o revoluto, cartilaginoso rara vez completamente entero llevando mucrones cortos, generalmente con dos a doce proyecciones aristadas de cada lado, si presenta dientes están principalmente hacia el ápice de la hoja; venas cinco a diez de cada lado, ramificándose y anastomosándose hacia el margen, algunos pasando directamente a los dientes marginales; superficie superior lustrosa, verde grisácea, evidentemente rugulosa, tanto en fresco como

secas, las venas primarias y secundarias impresas; superficie inferior gris-tomentosa a amarillenta, fuertemente ampollada ésta escasamente visible por la cubierta del pelo; venas conspicuamente elevadas y reticuladas; pecíolos 3 hasta 20 mm de longitud y de 1 a 1.5 mm de grueso, tomentosos a prácticamente glabros; flores estaminadas desconocidas; flores pistiladas una a cinco desde tomentosas a casi glabras, pedúnculo hasta 2 mm de longitud; fruto anual casi sésil o sobre un corto pedúnculo de 5 a 6 mm de longitud; copa hemisférica de 12 a 15 mm de ancho, las escamas delgadas, gris pubescentes terminando en puntas agudas, bellota anchamente ovoide de 10 a 12 mm de longitud y 8 a 10 mm de ancho con la mitad incluida (De la Cerda 1999).

Especie encontrada formando pequeños manchones en el municipio de Calvillo en el Terrero del Refugio, a 2,300 m de altitud (De la Cerda 1999).

***Q. (Quercus) chihuahuensis* Trel., 1924**

Sinónimo: *Q. jalisciensis*.

Árbol de 4-8 m de alto, el tronco de 30 a 60 cm de diámetro, corteza gris con estrías escamosas, ramillas de 2 a 4 mm de grueso muy tomentosas, el tomento persistente por varias estaciones, yemas de 2 a 4 mm de longitud ovoides obtusos, las escamas pilosas, estípulas de 5 a 8 mm de longitud deciduas pero persistentes cerca de las yemas terminales; hojas jóvenes densamente gris tomentosas abajo; verdes arriba con pubescencia floja de pelos estrellados; hojas tardíamente deciduas, al madurar coriáceas flojas pero densamente gris o amarillo pubescente muy variable en forma, tamaño y tipo de dientes, las hojas ovadas, oblongo-obovadas o elípticas de 3 hasta 22 cm de longitud y de 2.5 a 13 cm de ancho obtusas o anchamente redondeadas o algunas veces subagudas y cortamente mucronadas en la punta, anchamente redondeadas a subcordadas en la base, enteras, sinuado dentadas, obtusamente serradas o lobulado-serrado, margen engrosado plano o revoluto si presenta dientes seis a ocho de cada lado algunas veces terminando con un ancho mucrón, venas ocho a once de cada lado fuertes y arqueadas las superiores terminando en los dientes si están presentes, otras muy ramificadas y anastomosadas, superficie inferior de la hoja pálida flojamente pilosa, la epidermis glauca papilosa y escasamente glandular-granular, en ocasiones lisa o ampollada no cubierta completamente por los pelos estrellados estipitados, las venas primarias elevadas y prominentes, las

secundarias cubiertas por la pubescencia, pecíolos 2-12 mm de longitud y 1-3.5 mm de grueso incluyendo el tomento persistente, amentos estaminados 2-5 cm de longitud tomentosos, el perianto piloso, las anteras 1.3 mm de longitud; flores pistiladas dispuestas sobre un pedúnculo fuerte y tomentoso, fruto anual solitario o en pares, las escamas canescente-tomentosas engrosadas en la base y punta obtusa, bellota ovoide de 12-15 mm, la mitad incluida en la copa (De la Cerda 1999).

Este encino presenta gran variación en cuanto a formas de la hoja como se observa en colecciones hechas entre el municipio de Aguascalientes y Calvillo; se presentan plantas con hojas de diversas formas algunas de margen casi entero o entero las cuales tienen relación con *Quercus grisea* (Mc Vaugh 1974). Se distribuye en los municipios de Pabellón, Aguascalientes, Cosío, Calvillo y San José de Gracia a una altitud que varía de los 1,750 a 2,500 m (De la Cerda 1999).

***Q. (Lobatae) coccolobifolia* Trel., 1924**

Sinónimo: *Q. endlichiana*, *Q. jonessi*.

Árbol de 6 a 15 m de alto, el tronco de 50 a 70 cm de diámetro con corteza oscura cuadrículada, ramillas de 3 a 7 mm de grueso púrpura o café rojizo con abundantes lenticelas al principio glandular puberulento y estrellado pubescente pero pronto lustrosas y casi glabras; yemas 6-10 mm de longitud ovoides, agudas café claro, las escamas pilosas y largamente ciliadas, estípulas lineares persistentes sobre las yemas terminales; hojas cuando jóvenes gruesas cubiertas en el envés por una masa de pelos simples glandulares rojizos y sobre la superficie superior pequeños pelos estrellados; maduras las hojas muy gruesas y rígidas anchamente ovadas a suborbiculares redondeadas en la punta, de 10-19 cm de longitud y 5-14 cm de ancho algunas veces tan anchas como largas, la punta algunas veces aristada acuminada, el margen engrosado ondulado pero no revoluto, algunas veces entero o llevando mucrones cortos cerca de la punta de la hoja; base cordada con aurículas redondeadas, venas 5 a 8 de cada lado fuertes, las venillas anastomosándose cerca del margen, elevadas, superficie inferior de la hoja pálida amarillenta, coloreada en partes por la pubescencia glandular granular, otras veces glabra, la epidermis pálida lustrosa papilosa; pecíolos cortos 5-13 mm de longitud y 2 a 4.5 mm de grueso en la base, rojizos, persistentemente tomentosos sobre la cara interna, algunas veces glabro; las flores esta

minadas desconocidas, pistiladas solitarias o en pares pilosas, sésiles sobre fuertes pedúnculos de 1 a 3 mm de longitud, fruto anual, sésil solitario o en pares, copa hemisférica de cerda de 10 mm de ancho café claro con las escamas apretadas con la punta redondeada a obtusa, ciliadas, bellota ovoide 8-10 mm de longitud incluida la mitad de la copa (De la Cerda 1999).

Esta especie se distribuye escasamente en forma de manchones en algunas laderas pedregosas calizas en el municipio de San José de Gracia siempre asociado a *Pinus lumholtzi*, a una altitud de 2,400 a 2,500 m. (De la Cerda 1999).

***Q. (Quercus) depressipes* Trel., 1924**

Sinónimos: *Q. bocoyneensis*, *Q. deserticola*

Nombre común: encinillo

Arbusto rizomatoso de 1.20-3.0 m de alto, más frecuente de 0.30-0.80 m de alto formando densos matorrales de poca altura, difíciles de penetrar, la planta glabra; corteza escamosa grisácea; ramillas de 1-2 mm de diámetro, de color castaño rojizo a castaño grisáceo, pocas o muchas lenticelas inconspicuas; yemas de 1-2 mm de largo, corto-ovoides o subglobosas, de color castaño rojizo, las escamas ciliadas; estípulas de 3-5 mm de largo, pronto caedizas, rara vez presentes en ramillas maduras; hojas verde-azulosas, gruesas y coriáceas, de 5-40 mm de largo (en hojas de renuevos vigorosos hasta de 55 mm), de 4-25 mm de diámetro, oblongas, elípticas o levemente obovadas, ápice ampliamente redondeado o subagudo, la base cordada a subcordada; borde plano o ligeramente revoluto, rara vez del todo entero, generalmente con 1-6 puntas callosas o dientes mucronados en cada lado de la hoja, distribuidos arriba de la mitad de la hoja, cuando son más de 3 pueden llegar casi hasta la base de la hoja; nervaduras de 4-8 en cada lado, con pocas intermedias algo levantadas, a veces arqueado ascendentes, ramificándose y anastomosándose bien en el borde; haz lustroso, con células de la epidermis refractivas, conspicuas y de pared gruesa; envés sin brillo, minutamente glandular e inconspicuamente papiloso; pecíolos de 1-3 mm de largo, rojizos con manchas glaucas, fuertemente deprimidos de la parte adyacente a la base de la hoja; amentos masculinos escasamente de 20 mm de largo, más bien densos, las anteras glabras, ligeramente exertas; flores femeninas 2, sobre un pedúnculo de 0.6 mm de diámetro; fruto anual, solitario o en pares, sobre un pedúnculo glabro de 10-35 mm de

largo; cúpula hemisférica, de 7-15 mm de diámetro, las escamas adpresas, de color castaño rojizo y de ápice ciliado: bellota de elipsoidal a ovoide, de 12-15 mm de largo, de 6-15 mm de diámetro, $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ de su largo incluida en la cúpula (González-Villarreal 1986).

Su hábitat es matorral xerófilo en laderas de exposición N-NW, en suelos calcáreos y delgados. Se asocia a individuos aislados de *Quercus laeta*, *Q. praeco*, en altitudes que varían de los 1,830 a 2,500 m (González-Villarreal 1986).

***Q. (Lobatae) eduardii* Trel., 1922**

Sinónimo: *Q. oligodonta*.

Nombre común: encino rojo

Árbol de 5 a 10 m de alto a veces de porte más bajo, con tronco de 20 a 45 cm de grueso con la corteza oscura áspera formando cuadros, ramillas de 1 a 1.5 mm de grueso, cuando jóvenes tomentosas y cubiertas con pelos glandulares con la edad pálido tomentosas o poco pubescentes, corteza café rojiza o casi negra con numerosas lenticelas, yemas ovoides agudas de 1.5 a 3.5 mm de largo café lustrosas, las escamas ciliadas, las estípulas de 4.5 a 6 mm de longitud, pilosas oblanceoladas cayendo en abril y mayo o rara vez persistentes por un tiempo sobre la yema terminal, hojas pequeñas verdes sobre ambos lados pero notablemente más pálida abajo, rígidas coriáceas, oblongo-elípticos a ovado-lanceoladas ocasionalmente oblanceoladas a obovadas de 2 a 6.5 cm de longitud y de 1-3 cm de ancho, agudas o subagudas en el ápice pero algunas hojas de la misma planta con ápices obtusos o redondeados, base cordada o subcordada, margen plano o ligeramente revoluto, rara vez en las hojas completamente enteras, generalmente denticuladas dentadas o serradas con uno a cinco dientes aristados de cada lado, enteras de la mitad hacia la base, cinco a ocho venas de cada lado anastomosadas y ramificadas hasta el margen, a menudo en zigzag cerca de la punta; superficie superior lustrosa verde oscuro o verde grisáceo casi glabras o con pelos estrellados cerca de la base; venas y venillas convexas arriba, envés menos lustroso uniforme pero esparcidamente con pelos estrellados con mechones de pelos en las axilas de las venas, pecíolos 2-7 mm de longitud pálidos o rojizos 1 a 1.3 mm de grueso escasamente tomentosos; amentos estaminados de 1.5 a 3 cm de longitud con el raquis densamente piloso, perianto de 2 mm de longitud anchamente campanulado casi glabro, los lóbulos ciliados, anteras glabras; flores pistiladas 1 o 2 sobre un pedúnculo de 1-

4 mm de longitud; fruto anual casi sésil, la copa de 10 mm de diámetro con escamas delgadas apretadas al principio tomentosas finalmente glabras de color café, bellota ovoide de 10 mm de longitud la mitad incluida (De la Cerda 1999).

Esta especie es de las de mayor distribución en el estado. Se encuentra en los municipios de Jesús María, Pabellón, Aguascalientes, Calvillo y San José de Gracia a altitudes que varían de 1,900 a 2,700 m (De la Cerda 1999).

***Q. (Lobatae) gentryi* C. H. Mull., 1942**

Árbol de 8 a 15 m de alto rara vez más, el tronco de 30 a 50 cm de diámetro; las ramillas de 1 a 1.5 mm de grueso al principio estrellado pubescente y glabro o casi glabro en la siguiente estación, con la corteza café rojiza con numerosas lenticelas pequeñas; yemas ovoides o agudas de 2 a 4.5 mm de longitud con escamas ciliadas; estípulas linear-subuladas pilosas, deciduas, persistentes cerca de las yemas terminales, hojas jóvenes verdes finamente estrellado pubescente arriba, con pubescencia estrellada y más densa en el envés principalmente en la vena media, cubierta además con pelos glandulares rojizos o amarillentos; hojas maduras enteras verde brillante, pálidas o amarillentas abajo, delgadas pero firmes, muy tardíamente deciduas, estrechamente elípticas a lanceoladas y oblanceoladas de 3 a 18 cm de largo y 1.5 a 4 cm de ancho, con la punta aguda, acuminada o atenuada terminando en una arista o mucrón, con base redondeada a obtusa; margen con engrosamientos cartilagosos a veces revoluto, usualmente ondulado, venas 10 a 15 sobre cada lado con varias intermedias más cortas partiendo de la nervadura media y formando un ángulo entre 45 y 80° ramificándose y anastomosándose cerca del margen; superficie superior de la hoja verde oscuro casi glabra pero con espaciados pelos estrellados muy pequeños, superficie inferior verde amarillento, la epidermis ampollada y papilosa al madurar completamente glabra excepto en las axilas de las nervaduras laterales que llevan pelos estipitados de color claro, además de pelos glandulares esparcidamente persistentes, las venas más pequeñas visibles sólo como delgadas líneas impresas entre las ampollas de la epidermis; pecíolos 2-10 mm de longitud y de 1 a 1.5 mm de grueso en el base; amentos estaminados de 3 cm de longitud con muchas flores, perianto en forma de copa, los lóbulos pubescentes, anteras 1.5 mm de longitud glabras; flores pistiladas una a tres sobre pedúnculos fuertes de 3 a 10 mm de longitud y 1.5 mm de grueso; fruto bianual solitario o

en pares con un pedúnculo con lenticelas prominentes; copa hemisférica de cerca de 15 mm de ancho y 10 mm de alto, el margen engrosado y enrollado, escamas delgadas apretadas estrechas y redondeadas de color café claro; bellota anchamente ovoide de 1 cm de ancho dos tercios o más incluida (De la Cerda 1999).

Su distribución se restringe a 2 municipios dentro del estado, en zonas húmedas de Calvillo en donde se encuentra más o menos abundante y San José de Gracia solo localizado en una barranca a altitudes que van de 1,900 a 2,400 m (De la Cerda 1999).

***Q. (Quercus) grisea* Liebm., 1947**

Árbol bajo de 4 a 7 m de alto con un tronco corto de 10 a 30 cm de diámetro, corteza gris claro y follaje verde grisáceo tomentoso; ramillas de 1 a 2 mm de grueso al principio densamente tomen tosas persistiendo el tomento por 2 o 3 años, la corteza de las ramillas áspera café oscuro a negro con lenticelas poco notables, yemas redondeado-ovoides de 2 mm de longitud, café, las escamas ciliadas, estípulas subuladas de 3 a 6 mm de longitud pilosas deciduas; hojas generalmente deciduas algunas persistentes hasta la siguiente estación gruesas de 2 a 8 cm de largo y de 1.5 a 4 cm de ancho, oblongo-elípticas a ovadas agudas, y cortamente mucronadas, obtusas o redondeadas en el ápice, redondeadas a subcordadas en la base, casi planas, el margen no o escasamente revoluto, poco engrosado entero, rara vez presentan algunos dientes cortos arriba en la mitad de la hoja; venas seis a diez de cada lado muy ramificadas; superficie superior de la hoja algunas veces lustrosa pero generalmente cubierta por abundantes pelos estrellados con ramas sobrepuestas, las venas poco impresas, las venillas poco marcadas, superficie inferior permanente y cerradamente tomen tosas cubriendo totalmente la superficie con pelos estrellados sésiles de diferentes tamaños, pecíolos 2-10 mm de longitud y de 1 mm de grueso o menos, tomentoso; amentos estaminados 2-7 cm de longitud con pocas flores, pilosos, las anteras glabras de 1 a 1.2 mm de longitud; flores pistiladas una a ocho dispuestas a lo largo de un pedúnculo tomen toso; fruto anual solitario o en pares desarrollándose muy en la base del pedúnculo; copa de 8 a 15 mm de ancho y 4 a 10 mm de alto hemisférica redondeada en la base, las escamas inferiores engrosadas en sus bases, pálido tomentosas, las puntas delgadas café rojizas y esparcidamente pubescentes, las escamas superiores elongadas obtusas y ciliado algodonosas; bellota ovoide o elipsoide de 12 a 18 mm de longitud 8 a 12

mm de grueso, café claro incluida en la copa una mitad la base únicamente (De la Cerda 1999).

Este encino se encuentra formando manchones puros constando de árboles aislados con pastizales o mezclados con *Juniperus deppeana* en el municipio de San José de Gracia que es donde se encuentra con mayor abundancia; también se encuentra en el municipio de Calvillo a altitudes de 2,300 a 2,530 m. Presenta bastante semejanza con *Q. chihuahuensis* que presentan las hojas con bordes enteros, sugiriendo algunos autores que posiblemente hay hibridismo entre *Q. grisea* y *Q. chihuahuensis* (De la Cerda 1999).

***Q. (Quercus) laeta* Liebm., 1854**

Sinónimos: *Q. pallescens*, *Q. bipedalis*, *Q. obscura*, *Q. transmontana*.

Nombre común: encino chaparro

Pequeño árbol de 5 a 8 m de alto con un tronco corto de 25 a 40 cm de diámetro; ramillas de 1.5 a 2.5 mm de grueso cuando muy jóvenes densamente pálido tomen toso y glandular, rara vez glabrescente pero generalmente la pubescencia persiste en la segunda estación, la corteza café rojiza a negra con lenticelas conspicuas de color pálido; yemas de 2 a 3.5 mm de longitud ovoide obtusas, las escamas con el margen ciliado; estipulas membranosas, escariosas, de 5 a 6 mm de longitud, deciduas o persistentes por un tiempo las situadas cerca de la punta de las ramillas; hojas jóvenes verdes o rojizas al principio esparcidamente estrellado pubescente y con abundantes pelos glandulares simples de más de 0.5 mm de longitud, superficie inferior tomentosa con muchos pelos glandulares confinados a las venas, hojas deciduas cuando maduran, duras y coriáceas verde oscuro y brillante arriba pálidas abajo, estrechamente elípticas a oblongas, lanceoladas, oblanceoladas, obovadas, rara vez ovadas, de 3 a 12 cm de largo y de 2 a 6.5 cm de ancho. obtusas, estrechamente redondeadas o agudas en la punta, abruptamente redondeadas a cordadas en la base margen engrosado y revoluto, algunas veces completamente entero, las hojas más vigorosas con 1 a 7 dientes mucronados arriba de la mitad o cerca de la punta, los dientes de 5 a 8 mm de alto distantes; venas 8 a 11 sobre cada lado a veces pasando directamente sobre los dientes o anastomosándose cerca del margen; superficie superior dura lustrosa pubescente cerca de la base de la hoja y en algunas partes protegidas, venas primarias y secundarias impresas en las hojas más maduras, variando de notablemente

rugosas a prácticamente planas; superficie inferior uniforme y finamente pubescente con pelos estrellados sésiles y algunos glandulares rojizos persistentes sobre las venas, la epidermis glauca, blanco papilosa, otras veces glabra escasamente ampollada, venas primarias y secundarias conspicuas; pecíolos de 2-8 mm de longitud pubescentes, de 1.5 mm de grueso en la base; amentos estaminados de 4 a 6 cm de longitud piloso o tomentoso y glandular, el perianto de 2.5 a 3 mm, las anteras glabras o pilosas de 1 a 1.3 mm de longitud; flores pistiladas de una a tres cerca de la punta del pedúnculo pubescente; fruto anual solitario o en pares, la copa hemisférica de 12-15 mm de ancho, las escamas engrosadas en la base con puntas obtusas estrechas, bellota ovoide 12 a 18 mm de longitud un tercio o la mitad incluida (De la Cerda 1999).

Esta especie junto con *Q. potosina* tiene una amplia distribución en el estado, posee gran dimorfismo foliar en un mismo árbol o en árboles diferentes lo que dificulta enormemente su identificación. Se localiza en los municipios de Jesús María, Aguascalientes, Tepezalá, Calvillo y San José de Gracia a una altitud que varía de 1,900 a 2,650 m (De la Cerda 1999).

***Q. (Quercus) microphylla* Née., 1801**

Sinónimo: *Q. striatula*

Arbusto rizomatoso de 30 a 60 cm de alto o menos aunque se pueden encontrar de más. de un metro de alto, ramillas de 1 a 1.5 mm de grueso gris tomentosas glabrescentes al segundo o tercer año, la corteza café rojiza a negra con lenticelas poco notorias; yemas de 1 a 2 mm de longitud ovadas obtusas, las escamas ciliadas, estipulas filiformes o subuladas 3-5 mm de longitud pilosas persistentes por un tiempo sobre las yemas terminales; hojas pequeñas verde grisáceas o amarillento en el envés, elíptico lanceoladas o elíptico-ovadas de 1.5 a 3.5 cm de longitud y de 1.2 a 2.5 cm de ancho, agudas, subagudas y mucronadas en el ápice pudiendo ser obtusas redondeadas y sin mucrón; base redondeada o cordada, margen engrosado y fuertemente revoluto, generalmente entero pero puede presentarse ondulado con uno o dos dientes mucronados arriba de la mitad; venas cuatro a ocho de cada lado ascendentes ramificándose y anastomosándose hacia el margen notorias o poco impresas en el haz; superficie superior dura, algunas veces lustrosa persistente y copiosamente estrellado pubescente; superficie inferior cerradamente pubescente gris o gris

amarillento, los pelos sésiles y traslapados que cubren la epidermis glandular y papilosa, pecíolos tomentosos de 1.5 a 3 mm de longitud y de cerca de 1 mm de grueso oculto entre los lados de las bases de las hojas; amentos estaminados desconocidos; flores pistiladas una a tres sobre un pedúnculo tomentoso de 1 cm de longitud; fruto solitario o en pares, la copa hemisférica de 10 a 13 mm, las escamas gris tomentosas y escasamente engrosadas en la base apretadas con puntas obtusas triangulares y ciliadas, bellota ovoide de 10 a 12 mm de longitud con la mitad incluida en la cúpula (De la Cerda 1999).

Este pequeño encino es bastante abundante en el municipio de San José de Gracia en sitios abiertos con encinos más altos, asociados a *Pinus teocote* y *P. leiophylla* a una altitud que va de 2,350 a 2,530 m (De la Cerda 1999).

***Q. (Quercus) potosina* Trel., 1924**

Nombre común: encino chaparro

Árbol de 3 a 7 m de alto con copa redondeada, tronco corto de 15 a 30 cm de grueso con corteza gris escamosa a veces es un arbusto de 2-3 m de altura, ramillas gruesas notablemente rojizas flojamente estrellado tomentoso o pilosas y glandular-granular, lenticelas conspicuas sobre las ramillas oscuras; yemas café rojizo de 3 a 6 mm de longitud ovoides agudas, estípulas filiforme-subuladas de 6 a 10 mm de longitud pilosas escariosas persistentes cerca de las yemas terminales; las hojas jóvenes amarillentas abajo por la gran cantidad de pelos glandulares vermiformes; la superficie superior con pequeños pelos estrellados y esparcidos pelos glandulares rojizos; hojas tardíamente deciduas; hojas maduras rígidamente coriáceas verde amarillento con venas y pecíolos rojizos, las hojas denticuladas o serruladas, obovadas a suborbiculares, oblongas u oblanceoladas 2 a 9 cm de longitud y 2 a 7 cm de ancho, anchamente redondeadas u obtusas en el ápice, o apareciendo agudas o subagudas con un largo diente mucronado terminal, cordada-auriculada en la base; margen engrosado y algunas veces revoluto entre los dientes, éstos de cuatro a trece de cada lado abajo de la mitad o cerca de la punta de la hoja, a veces aparecen hasta cerca de la base siendo pequeños todos o casi todos terminando en un fuerte mucrón de 0.5 mm de longitud; venas de 7 a 10 sobre cada lado, ascendentes pasando directamente a los dientes cuando éstos están presentes ramificándose o no antes de llegar a los dientes; superficie superior dura y algunas veces lustrosa, verde oscuro o verde amarillento

glabrescentes con la edad pero usualmente reteniendo muchos pelos estrellados, completamente planas o moderadamente rugosas, las venas y venillas algunas veces impresas formando una red; superficie inferior y epidermis pálida glauca casi lisa algunas veces papilosa con gran cantidad de pelos glandulares de color ámbar parcialmente cubiertos por los pelos estrellados sésiles muy ramificados de color pálido, venas primarias y secundarias notorias y elevadas, las más pequeñas escasamente visibles; pecíolos 3 a 9 mm de longitud rojizos pilosos o tomentosos ocultos entre las aurículas de la base de las hojas; amentos masculinos de 3 a 5 cm de longitud o más, tomentulosos, el perianto piloso de 3 mm de ancho cuando está expandido, las anteras de 1 mm de longitud glabras; flores pistiladas 2 a 10 sobre un pedúnculo tomentoso de 1 a 3 mm de longitud, fruto anual solitario o en pares de 1 cm o menos desde la base del pedúnculo, copa hemisférica de 12 a 20 mm de ancho, las escamas con bases engrosadas canescentes y puntas romas; bellota ovoide 15 a 18 mm de longitud, la mitad incluida (De la Cerda 1999).

Esta especie de encino es la más abundante de las encontradas en el estado y la de mayor dimorfismo foliar; se localiza en los municipios de Jesús María, Aguascalientes, Cosío, Tepezalá, Calvillo, El Llano y San José de Gracia a una altitud que va de 1,890 a 2,650 m, asociado casi siempre a *Q. laeta* y *Q. eduardi* (De la Cerda 1999).

***Q. (Quercus) praeco* Trel., 1924**

Árbol de tronco corto, de 3 -7 m de alto, con un diámetro de 30 - 40 cm, con copa extendida; ramillas de 2-4 mm de diámetro, incluyendo el tomento blanco-amarillento que persiste por varios años; yemas de 2-4 mm de largo, ovoides, obtusas y tomentosas; estípulas de 5-9 mm de largo, escariosas, persistentes, al principio del año; hojasdecíduas, obovadas, elíptico-obovadas, de 6-14 cm de largo, de 2.5-8 cm de ancho, redondeadas u obtusas, alguna vez subagudas del ápice y gradualmente más angostas y terminando abruptamente en una base redondeada o subcordada; bordes gruesos y marcadamente revolutos, de sinuado-dentados a subenteros, pero siempre con unos cuantos mucrones cortos o generalmente con dientes ganchudos distribuidos desde la mitad o cerca de la base de la hoja hasta el ápice; dientes de 4-10 en cada lado, toscamente mucronados; nervaduras de 6-12 en cada lado incluyendo algunas cortas intermedias ascendentes que llegan hasta los bordes o dientes, si éstos están presentes; haz verde y de vez en cuando lustroso, pero

algunas veces opaco debido a los pelos que cubren la superficie, los pelos erectos, con frecuencia sobrepuestos; nervaduras primarias y especialmente las secundarias impresas, la superficie notablemente rugulosa; nervaduras más pequeñas pálidas e inconspicuas; envés casi pálido o amarillento tomentoso o con numerosos pelos estrellados diseminados y sobrepuestos; epidermis verde pálido, papilosa, arrugada, escasamente ampollosa; nervaduras primarias y secundarias muy elevadas, conspicuas, las más pequeñas cubiertas por los pelos; peciolo de 4-12 mm de largo, tomentoso, de 2-2.5 mm de ancho, incluyendo el tomento; amentos masculinos de flores esparcidas, de 6 cm de largo, raquis y perianto pilosos, los pelos largos y enredados, anteras oblongas, pilosas, de 0.6-0.7 mm de largo; flores femeninas agrupadas en racimos hacia el final de un pedúnculo tomentoso, de 2.5-11) cm de largo; fruto anual, solitario o en grupos de 1-8; cúpula campaniforme, de 20-25 mm de diámetro, margen fuertemente enrollado, las escamas cubren hasta la base, de color castaño claro, convexas, canescente-tomentosas, terminan en puntas triangulares y erectas, flojamente adpresas, las escamas cercanas al borde encorvadas hacia el interior de la cúpula; bellota ovoide, de 17-20 mm de largo, de 10-15 mm de diámetro, cerca de la mitad de su largo incluida en la cúpula (González-Villarreal 1986).

Su hábitat es un suelo seco y pedregoso, con presencia de *Pinus chihuahuana* y *Dodonea viscosa*; en la parte baja del encinar se asocia principalmente a *Quercus resinosa*, *Q. eduardii*, *Q. laeta* y *Q. gentry*, en altitudes que varían de los 1,700 a 2,100 m (González-Villarreal 1986).

***Q. (Quercus) repanda* Humb. & Bonpl., 1809**

Sinónimos: *Q. lecomteana*, *Q. revoluta*, *Q. subtriloba*

Hojas maduras de forma elíptica u obovada-angosta; ápice obtuso convexo, pocas veces redondeado; base simétrica o asimétrica, obtusa redondeada; margen dentado crenado o entero, revoluto o poco revoluto, con mucrones rollizos o convexos de 0.2-0.4 cm de largo; venación camptódroma; relación ancho de lámina/diámetro de vena primaria: fuerte; venas secundarias que divergen de la primaria en ángulo agudo-moderado (45-65°) y en ocasiones agudo-angosto (<45°), presenta 2-4 venas intersecundarias simples; venas terciarias con ángulo de origen agudo-agudo o agudo-recto, percurrentes alternas, recorrido convexo; venas de cuarto orden de tamaño fino o moderado, de trayectoria ortogonal; venas

de quinto orden de tamaño fino y trayectoria ortogonal; vena última marginal incompleta; vénulas simples; areolas bien desarrolladas, orientadas, forma irregular o pentagonal, tamaño pequeño; haz verde grisáceo con tricomas fasciculados sésiles de 14-16 ramas; envés densamente tomentoso, pardo-amarillento con tricomas fasciculados de 16-21 ramas, sésiles o con estípites corto, algunas veces presenta tricomas glandulares de color ámbar; epidermis ampulosa y papilosa; pecíolo de 3-7 mm de largo por 1-1.2 mm de diámetro; estomas de tipo anomocítico (Rodríguez-Rivera y Romero-Rangel 2007)

***Q. (Quercus) resinosa* Liemb., 1854**

Sinónimo: *Q. macrophylla*.

Nombre común: roble, encino roble

Árbol de 6-10 m de alto con un tronco corto de 30 a 70 cm de diámetro, corteza delgada gris, escamosa, ramillas delgadas y cortas de 4 a 10 mm de grueso, densamente tomentosas, los pelos al principio mezclados con pelos simples glandulares rojizos, corteza café grisácea a negra las lenticelas numerosas pero poco notorias, yemas de 3 a 6 mm de longitud rara vez prominentes, ovoides, agudas café pálido, las escamas largamente ciliadas, estípulas 8-15 mm de longitud de linear a subuladas densamente pilosas, deciduas, persistentes en las yemas terminales por dos o más estaciones; las hojas jóvenes tomentosas sobre ambos lados, rojiza en la parte superior por la cubierta de pelos glandulares largos y fuertes además de los pelos estrellados; la superficie inferior densamente pálido tomentosa con pelos glandulares únicamente en las venas; hojas maduras deciduas grandes y tiesas, pálido tomentosas abajo, anchamente obovadas de 10 a 30 cm de longitud y de 8 a 20 cm de ancho con ápice redondeado, obtuso o acuminado, bases subcordadas, margen ondulado engrosado, revoluto, sinuado o sinuado dentado, los dientes de ocho a dieciocho sobre cada lado algunos muy bajos redondeados y asimétricos, venas de diez a veinte de cada lado, generalmente paralelas sin nervios intermedios notorios o pasando directamente a los dientes cuando éstos están presentes rara vez se anastomosan cerca del margen; superficie superior algunas veces lustrosa pero generalmente estrellado pubescente, rugulosas, las venas fuertes y bien marcadas; superficie inferior densamente pálido tomentosa a finamente piloso los pelos sésiles se traslapan pero no cubren totalmente la epidermis verde papilosa no fuertemente ampollada, las venas primarias y secundarias formando un retículo fuerte;

pecíolos 4-10 mm de longitud y 4-6 mm de ancho tomentos ocultos entre las bases de las hojas, amentos estaminados de 7-15 cm de longitud interrumpido piloso y glandular, anteras pilosas de 1.6 a 1.8 mm de longitud; flores pistiladas 1 a 5 en grupos o esparcidas en un pedúnculo tomentoso; fruto anual 1 a 3 en un pedúnculo de 15 a 20 cm de longitud y de 2 a 3 mm de grueso, copa hemisférica o altamente profunda de 15 a 25 mm de ancho gris tomentosa dentro, las escamas gris tomentosas sin bases engrosadas, bellota ovoide 15-32 mm de longitud y 15 a 20 mm de grueso con pared delgada rugosa en seco excepto cuando madura completamente, cerca de un tercio incluida en la cúpula (De la Cerda 1999).

Esta especie se encuentra dentro del estado a diferencia de los otros encinos a menor altitud y en sitios más secos, en ocasiones mezclado con diferentes tipos de matorral; se localiza en los municipios de Jesús María, Pabellón, Aguascalientes, Calvillo, El Llano y San José de Gracia a una altitud de 1,890 a 2,530 m (De la Cerda 1999).

***Q. (Quercus) rugosa* Née. 1801**

Sinónimos: *Q. reticulate*, *Q. conglomerata*, *Q. durangensis*, *Q. rhodophlebia*, *Q. suchiensis*.

Nombre común: encino blanco.

Árbol de 20 m de alto o más con un tronco de 1 m o más de diámetro, ramillas fuertes de 24 mm de grueso cuando jóvenes glandulares y finamente tomentulosas, glabra o casi glabra después de una estación, con numerosas lenticelas pálidas, yemas de 2 a 4 mm de longitud ovoides obtusas inconspicuas, estípulas escariosas pilosas de 8 a 12 mm de longitud, deciduas, persistentes cerca de los nudos terminales, hojas jóvenes notablemente bicoloras, verdes y esparcidamente pubescentes arriba con abundantes pelos glandulares muy cortos y rojizos; la superficie inferior densamente pálido tomentosa glandular únicamente en las venas; hojas siempre verdes o tardíamente deciduas al madurar muy gruesas y rígidas cóncavas abajo, fuertemente rugosas, obovadas a elíptico-obovadas, rara vez suborbicular de 5 a 15 cm de longitud y de 3 a 8 cm de ancho, obtusas o redondeadas en el ápice, anchamente redondeadas a cordadas en la base irregularmente denticuladas o serradas a subenteras margen engrosado, dientes 5-15 sobre cada lado, muy abundantes arriba de la mitad de la hoja, usualmente bajos y obtusos de tres a seis mm de alto o muy reducidos y el margen aparece ondulado, en los dientes se presenta un mucrón corto y

fuerte de 1 mm de longitud; venas de ocho a doce de cada lado pasando directamente dentro de los dientes o anastomosándose dentro del margen; superficie superior dura algunas veces lustrosa, glabra excepto cerca de la base de la nervadura media, en seco verde amarillento pálido, fuertemente rugulosas, las venas primarias y secundarias impresas formando una red sobre una superficie verde; envés densa a finamente pilosa con mechones de pelos ramificados de 1 mm de longitud y abundantemente glandular-puberulenta de color amarillo rojizo, esta pubescencia cubriendo la epidermis glauca papilosa y ampollada, venas primarias y secundarias elevadas formando con las venillas una malla muy ramificada; peciolo 5 a 15 mm de longitud y 2 a 4 mm de grueso, pubescente y oculto entre las bases de la hoja; amentos estaminados de 3 a 6 cm de longitud, flores con el perianto piloso de 2.5 a 3 mm de ancho, anteras glabras; flores pistiladas dos a doce sobre un pedúnculo delgado; fruto anual solitario o en grupos de 2 a 3 sobre un pedúnculo pubescente 2-10 cm de longitud, copa de 10-15 mm de ancho hemisférica o con la base constreñida, escamas de las copas jóvenes flojas y abiertas, ya maduras con bases engrosadas café o negruzcas y puntas delgadas triangulares, bellota ovoide estrechamente puntiaguda 10-25 mm de longitud café claro, de un tercio a una mitad incluida en la cúpula (De la Cerda 1999).

Esta especie se localiza únicamente en dos municipios, Calvillo y San José de Gracia en zonas principalmente de barrancas asociado a *Pinus* o *Cupressus* a una altitud que varía de los 1,900 a 2,640 m (De la Cerda 1999).

***Q. (Lobatae) sideroxyla* Humb-Bonpl. 1809**

Sinónimo: *Q. omissa*,

Árbol pequeño a veces subarbusto de pocos metros de alto 6-9 m con un tronco de 30 a 60 cm de diámetro, ramillas de 1 a 2 mm de grueso cubiertas por un tomento gris amarillento persistentes hasta la siguiente estación con lenticelas planas poco notorias; yemas ovoides de 2.5 a 3 mm de longitud café lustrosas con escamas ciliadas, estípulas caedizas, hojas tardíamente deciduas muy gruesas y rígidas oblanceoladas a obovadas o elíptico-oblongas de 3.5 a 7.5 cm de longitud y de 1.5 a 3.5 cm de ancho, tosca y agudamente dentado y obtusa en el ápice o los dientes terminales triangulares, enteros de la mitad hacia la base cordada, auriculada o redondeada, los lados de la hoja tienden a

enrollarse hacia el envés cerca de la base; margen cartilaginoso engrosado y fuertemente revoluto, rara vez completamente entero, llevando de uno a cinco dientes aristados o pequeñas serraciones sobre cada lado generalmente confinados cerca del ápice a veces con puntas en forma de espinas de 0.5 a 1.2 mm de longitud, venas cinco a nueve de cada lado terminando en los dientes o anastomosándose cerca del margen; superficie superior dura, lustrosa en seco verde amarillento opaco, glabra excepto en la base de la nervadura media, oscuramente rugulosa, las venas principales impresas, las venillas poco notorias, las aréolas y venillas no diferentes en coloración; superficie inferior completamente cubierta por un tomento denso blanco amarillento, se notan las venas laterales elevadas; epidermis notoriamente ampollada, papilosa; pecíolos de 3 a 9 mm de longitud, algunas veces persistentemente tomentosos, adaxialmente aplanados, amentos estaminados tomentosos el perianto en forma de copa ciliado sobre el margen, las anteras oblongas y glabras; fruto bianual solitario o en pares, sésil o el pedúnculo de 1 cm de longitud; copa hemisférica o con la base prolongada de 10 a 13 mm de diámetro con escamas delgadas tomentosas de puntas obtusas; bellota ovoide de 10 a 13 mm de longitud y 10 mm de ancho un tercio incluido en la cúpula (De la Cerda 1999).

Este encino se localiza principalmente en el municipio de San José de Gracia en bosque de encino, encino-pino y en Calvillo en bosque de encino siendo menos abundante en este último municipio, a una altitud de 2,250 a 2,700 m (De la Cerda 1999).

1.4 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES DEL GÉNERO *Quercus*

El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas que permiten el mantener, desarrollar y manipular células, tejidos u órganos tomados de plantas bajo condiciones artificiales y controladas. Esto en medios de cultivo artificiales y en un ambiente libre de organismos contaminantes (axénico) (Pérez-Molphe-Balch *et al.* 1999). Una de las aplicaciones más interesantes de esta tecnología es la generación de nuevas plantas a partir de segmentos de tejidos cultivados *in vitro*. Estas plantas se generan en sistemas artificiales, pero posteriormente pueden ser adaptadas y transferidas a suelo, donde se comportan como plantas normales. A este proceso se le llama micropropagación o propagación masiva *in vitro*. Esta técnica permite la generación de un número prácticamente ilimitado de plantas en tiempos y espacios muy reducidos. Se trata de un sistema de propagación clonal lo que lo hace ideal para la propagación masiva de individuos seleccionados por sus características superiores. Por otro lado, al tratarse de cultivos axénicos, los materiales generados están libres de microorganismos patógenos, lo cual no ocurre con sistemas convencionales de propagación vegetativa (Pérez-Molphe-Balch *et al.* 1999).

A través de la micropropagación es posible realizar el manejo y mejoramiento de especies de ciclo de vida largo, difíciles de propagar por los métodos tradicionales, debido a problemas de autoincompatibilidad, o por ser altamente heterocigotas. En este caso se encuentran muchas especies de importancia forestal (Giri *et al.* 2004). En este tipo de especies, el cultivo de tejidos permite la rápida propagación de los materiales seleccionados sin que se pierdan las características deseables debido a la reproducción sexual. Los primeros trabajos relacionados con el cultivo *in vitro* de especies de interés forestal datan de 1940, sin embargo fue hasta la década de 1980 cuando se obtuvieron éxitos importantes, convirtiéndose esta técnica en una opción real para el manejo de estas especies (Thorpe *et al.* 1991).

A pesar de lo anterior, la micropropagación de muchas especies leñosas presenta dificultades. Los compuestos fenólicos excretados por los tejidos suelen ser un factor crítico para el establecimiento de los cultivos *in vitro*, ya que al oxidarse generan radicales

tóxicos para la célula vegetal. Por otro lado, el enraizamiento de los brotes generados *in vitro* también es especialmente difícil en las especies leñosas (Confalonieri *et al.* 2003).

El género *Quercus* es uno de los más importantes desde el punto de vista forestal. Sin embargo, su manejo resulta muy complicado debido a que sus semillas son recalcitrantes, por lo que no pueden ser almacenadas. Además, el período juvenil es muy extenso, la máxima capacidad en cuanto a la producción de semillas se alcanza hasta los 30-40 años de edad. Por otro lado, la producción de semillas en cantidades significativas ocurre solo cada 3 a 5 años. Por lo anterior, la propagación masiva de esta especie a través de métodos biotecnológicos resulta muy atractiva. En este sentido, la vía de regeneración más eficiente es la embriogénesis somática, la cual no solo es muy productiva, sino que también es la base para otras tecnologías como la producción de semillas artificiales (Prewin y Wilhelm 2003). La embriogénesis somática se ha logrado con varias especies del género *Quercus*, usando tejidos juveniles (embriones cigóticos) o tejidos tomados de árboles adultos (flores, tallos y hojas) (Wilhelm 2000). La propagación *in vitro* a través del cultivo de yemas también se ha descrito en especies del género *Quercus*, como *Q. leucotrichophora* y *Q. glauca* (Purohit *et al.* 2004).

De manera general, un sistema de propagación masiva *in vitro*, o micropropagación, aplicado a especies de encino, debe constar de las siguientes etapas:

Etapa I. Establecimiento de los cultivos axénicos. Esta etapa consiste en la elección del tipo de explante y la desinfección del mismo para iniciar un cultivo axénico. La elección del explante adecuado depende mucho de la especie y del sistema de multiplicación que se aplique en la etapa II. Para los sistemas de propagación por yemas o meristemas, propuestos en este caso para el género *Quercus*, los explantes iniciales, ápices o yemas axilares, generalmente se toman de individuos adultos. Sin embargo, en especies que presentan dificultades por la oxidación excesiva, o por el proceso de desinfección del material de campo, las yemas pueden tomarse de plántulas generadas a partir de semillas germinadas en condiciones axénicas. En el caso de la embriogénesis somática, vía de regeneración propuesta para encinos, los explantes suelen ser embriones sexuales maduros

o inmaduros. La desinfección del explante se hace mediante lavados y tratamientos con agentes como etanol e hipoclorito de sodio (Pérez-Molphe-Balch *et al.* 1999).

Etapa II. Multiplicación del tejido. Es en esta etapa donde se realiza la micropropagación, obteniéndose un gran número de nuevas plantas a partir de cantidades mínimas de tejido. Existen tres vías para la multiplicación *in vitro* de vegetales: a) Organogénesis. Este término, se refiere a la formación de novo de órganos en los explantes cultivados, por lo que implica una rediferenciación celular en el tejido. Los órganos que se pueden formar son las raíces o los brotes adventicios. Estos últimos son estructuras muy similares a una yema que tienen la capacidad de originar una nueva planta después de crecer y enraizar. b) Embriogénesis somática. Los tejidos cultivados *in vitro* bajo ciertas condiciones, tienen la capacidad de formar embriones mediante un proceso muy similar a la embriogénesis cigótica. A este proceso se le denomina embriogénesis somática, y es una de las vías más eficientes para la producción masiva de plantas. Los embriones somáticos tienen, al igual que los cigóticos, la capacidad de formar una nueva planta después de un proceso de germinación, con la diferencia de que la embriogénesis somática es un proceso asexual, por lo que la nueva planta será exactamente igual a la donadora de la célula inicial. Para que ocurra la embriogénesis somática indirecta se debe obtener primero tejido calloso, a partir del cual se obtendrá la diferenciación de los embriones somáticos en un segundo paso. Generalmente el tejido calloso se obtiene al inocular explantes en un medio que contenga auxinas sintéticas como el ac. 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), y la diferenciación de los embriones ocurre al retirar esta auxina del medio. c) Propagación por yemas, ápices o meristemos. Este sistema se basa en la formación de nuevos brotes a partir de meristemos preexistentes, por lo que no implica fenómenos de dediferenciación y rediferenciación celular como los que ocurren en la organogénesis y en la embriogénesis somática. Esta vía de regeneración se basa en el hecho de que los meristemos apicales y laterales, al ser de manera natural los puntos de crecimiento en los vegetales, tienen la capacidad de formar nuevos brotes. Esta capacidad natural la mantienen cuando se establecen y cultivan *in vitro*. Debido a lo anterior, el cultivo de yemas es una manera sencilla de obtener nuevos brotes, los cuales pueden enraizarse y producir así nuevas plantas. La adición de citocininas al medio de cultivo suele promover la brotación de las

yemas, por lo que es el tipo de regulador del crecimiento utilizado para esta vía de propagación (Pérez-Molphe-Balch *et al.* 1999).

Etapa III. Crecimiento y enraizamiento de los brotes. Lo que se obtiene en la etapa II son pequeños brotes, carentes de raíz (excepto si se obtuvieron por embriogénesis somática) y con poca probabilidad de adaptarse con éxito a las condiciones ambientales externas. El enraizamiento se puede lograr separando los brotes del explante original y transfiriéndolos a un medio de cultivo apropiado. La formación de raíces se favorece en medios diluidos, en ocasiones conteniendo auxinas o carbón activado. Alternativamente, se puede intentar el enraizamiento *in vivo*, transfiriendo los brotes generados en la etapa II directamente al substrato, previa aplicación de un enraizador comercial, y manteniendo el ambiente con alta humedad relativa. En este caso se incrementa la mortalidad al momento de transferir al substrato, pero se evita una etapa completa de la micropropagación, por lo que debe analizarse la conveniencia del enraizamiento *in vivo* para cada especie (Pérez-Molphe-Balch *et al.* 1999).

Etapa IV. Adaptación al medio externo: las plantas generadas y mantenidas *in vitro* presentan varias características que dificultan su supervivencia en el medio externo si se transfieren al mismo sin una etapa previa de adaptación. La alta humedad relativa dentro de los recipientes de cultivo hace que los mecanismos para evitar la pérdida de agua no funcionen adecuadamente. Por ello, el proceso de adaptación al ambiente externo de una planta generada *in vitro* debe ser lo más gradual posible, siendo lo más recomendable una reducción lenta de la humedad relativa, primero en el recipiente de cultivo, y luego fuera de éste, para permitir así el desarrollo de los sistemas de protección de la planta contra la desecación. Por otro lado, las plantas durante su cultivo *in vitro* no realizan una fotosíntesis normal, y sus requerimientos de carbono son satisfechos por el medio. La anatomía de las hojas difiere de la de las plantas que crecen *in vivo*, siendo éstas por lo general más delgadas y con menor concentración de clorofilas. Es por todo ello que el paso de las plantas generadas *in vitro* hacia la autotofía debe ser gradual, exponiéndoseles a incrementos paulatinos en la intensidad luminosa. Además, por tratarse de sistemas de cultivo axénicos, las plantas no han generado resistencia contra los microorganismos

potencialmente nocivos, por lo que es recomendable trabajar durante las primeras fases de la adaptación bajo las condiciones más higiénicas posibles. Por último, un aspecto importante a considerar en esta etapa es el sustrato al que serán transferidas las plantas micropropagadas. La elección del mismo dependerá de la especie trabajada (Pérez-Molphe-Balch *et al.* 1999).

Sistemas de propagación por embriogénesis somática para el género *Quercus*.

La vía de regeneración más eficiente, en este caso, es la embriogénesis somática, ya que no solo es muy productiva, sino que también es la base para otras tecnologías como la producción de semillas artificiales, tal es el caso de los embriones somáticos encapsulados de *Q. robur*, los cuales presentan un porcentaje más alto en la conversión y germinación, con respecto a los embriones somáticos no encapsulados (Prewein y Wilhelm 2003). En el género *Quercus*, la embriogénesis somática se alcanzó, ya en varias especies, partiendo tanto de tejidos juveniles (embriones cigóticos) como de tejidos maduros, tomados de árboles adultos (flores, tallos y hojas) (Wilhelm 2000). La embriogénesis directa se atribuye principalmente a tejidos juveniles (embriones cigóticos), considerando que la embriogénesis indirecta ocurre frecuentemente en la mayoría en los tejidos maduros (Wilhelm 2000). No obstante que una embriogénesis directa propia se observó en cortes de la superficie de pecíolo de un explante de hoja de *Q. suber* donde los embriones somáticos se desarrollaron directamente de la superficie hinchada del explante, el cual probablemente poseía células cercanas al estado embriogénico (Fernández-Guijarro *et al.* 1995). Una de las mayores limitaciones para el uso de la embriogénesis somática en el encino, es el bajo porcentaje de conversión y por consiguiente proporciones bajas de producción de planta. No obstante que las plántulas generadas de la embriogénesis somática son capaces de crecer en suelo, existe nula o escasa adaptación y aclimatación al medio externo. A pesar de su desarrollo normal al ser transferidas a suelo, las plantas detienen su crecimiento y mueren (Kim *et al.* 1997). Sin embargo, la inoculación con hongos ectomicorrícicos como *Scleroderma polyrhizum* y *Pisolithus tinctorius* mejoró el desarrollo de la raíz y la adaptación *ex vitro* (Wilhelm 2000). En el caso de las especies *Q. robur* y *Q. petraea*, existió un avance significativo en la adaptación al medio externo, logrando 78% de

sobrevivencia a la aclimatación de 70 y 62 plantas respectivamente y una vez trasplantados en campo su sobrevivencia fue de 81- 92% (Chalupa 1990).

Embriogénesis somática en tejidos juveniles (embriones cigóticos).

La inducción de la embriogénesis somática en especies de *Quercus* se describió en 1982, usando embriones cigóticos inmaduros y maduros de *Q. lebaní* (Srivastava y Steinhauer 1982). Actualmente existen numerosas publicaciones sobre una inducción exitosa de la embriogénesis somática en especies de *Quercus*. Los protocolos difieren ampliamente en relación a los medios de cultivo (MS, B5) y uso de reguladores de crecimiento vegetal. La combinación de auxinas y citocininas principalmente BA, provee buenos resultados, aunque la combinación de GA₃ con BA, también induce embriogénesis somática en *Q. robur* (Chalupa 1987). La inducción, el desarrollo y maduración de los embriones somáticos se logró en *Q. ilex*, en medio B5 complementado con BA 10 μM y NAA 10 μM. La reducción en la concentración de los macronutrientes mejoró la tasa de maduración de embriones somáticos y disminuyó la embriogénesis secundaria. El medio líquido incrementó el peso fresco de los embriones somáticos e indujo una proporción más alta de embriogénesis secundaria en comparación al medio solidificado con agar, siendo este último más adecuado para la maduración del embrión. La embriogénesis secundaria se controló cultivando los embriones somáticos en medios con una alta concentración de sacarosa y en condiciones normales de luz. La adición de sacarosa 270 mM al medio, estimuló la maduración, incrementó el peso seco y fresco y el potencial de germinación (Mauri y Manzanera 2003).

Embriogénesis somática en tejidos maduros (flores, tallos y hojas).

Recientemente existe un progreso significativo en la iniciación de embriogénesis somática de tejido maduro (partes de flor, hojas y tallos), especialmente de *Q. suber* y *Q. robur* (Fernández-Guijarro *et al.* 1995). Los segmentos internodales y de hoja de plántulas del encino *Q. robur*, se usan como fuente de explantes para inducir la embriogénesis somática. Los tratamientos con auxinas influyeron en la respuesta embriogénica, que sólo

ocurre inicialmente en combinación con diferentes concentraciones de citocininas, posteriormente, se subcultivan en un medio libre de reguladores de crecimiento en el que los embriones somáticos surgen indirectamente en la superficie del callo (Cuenca *et al.* 1999). Para la inducción de embriogénesis somática en muchos casos se usa el medio MS, en combinación con hidrolizado de caseína. Además es necesaria la adición del ANA o AIB y citocininas como la BA, en igual o menor concentración que las auxinas. El uso de polivinilpirrolidona (PVP) mejora la calidad y el rendimiento del embrión (Wilhelm 2000). La embriogénesis somática se logró en hojas de brotes, crecidos en ramas de *Q. suber*. La frecuencia de la inducción fue significativamente más alta cuando se aumentó el tiempo de exposición a los reguladores de crecimiento de siete a treinta días. La combinación de NAA y BA fue esencial para la inducción. El tamaño de la hoja tiene un efecto crucial, porque más allá de un cierto umbral, no puede obtenerse la embriogénesis (Hernández *et al.* 2003b). De la misma forma se logró inducir la embriogénesis somática y regeneración de *Q. robur*, obteniendo una frecuencia del 0.3 a 3.6% (Toribio *et al.* 2004). Por otro lado, se indujo la embriogénesis somática en hojas, de brotes crecidos en ramas de *Q. robur*. Los embriones somáticos se obtuvieron de forma indirecta en un medio de cultivo que contenía diferentes concentraciones de ANA y BA (Corredoira *et al.* 2006). En el caso de los explantes de hoja de *Q. robur* L., la habilidad de germinación y conversión de los embriones somáticos dependió fuertemente del genotipo en la que se alcanzó una tasa de conversión del 0 a 70%. Los análisis RAPD no arrojaron ninguna evidencia de variación genética entre las líneas embriogénicas establecidas de estos árboles, o entre estas líneas y los árboles de su origen, o entre los embriones somáticos derivados de plántulas y los árboles de origen (Valladares *et al.* 2006).

Germinación y conversión de los embriones somáticos.

En la regeneración de árboles de *Q. suber*, la inducción, la germinación y la conversión de los embriones somáticos, depende significativamente del genotipo (Hernández *et al.* 2003a; Kim *et al.* 1997). Los tratamientos osmóticos (altas concentraciones de sacarosa) y bajas temperaturas (4°C), también promueven la germinación (alargamiento de la radícula) y conversión de la planta a partir de embriones

somáticos de *Q. suber*. El tratamiento de 4°C aplicado antes de la germinación de los embriones en medio líquido MS, durante dos meses, mejoró substancialmente la tasa de germinación. Además al añadir 150 g.l⁻¹ de sacarosa aumentó la conversión, (75%) de embriones a plantas (García-Martín *et al.* 2001). El ABA también influye en la maduración y germinación de embriones somáticos de *Q. ilex*, reduciendo significativamente la embriogénesis recurrente no deseada en embriones somáticos maduros, sin afectar la germinación de los mismos. Además, la adición de sacarosa 90 y 450 mM también mejora la germinación, inhibiéndose a concentraciones mayores (Mauri and Manzanera 2004).

Elongación de embriones somáticos germinados.

En embriones somáticos germinados de *Q. suber* la aplicación de BA (0.04–4 mM) incrementó considerablemente la frecuencia de elongación del tallo y mantuvo el crecimiento activo de las plántulas, aunque no tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de brotes con una morfología normal. Bajas concentraciones de BA (0.04 mM) permitieron la elongación apropiada de la radícula en todos los embriones somáticos germinados, pero las concentraciones altas la inhibieron (González-Benito *et al.* 2002).

Otros sistemas de propagación para el género *Quercus*

Se obtuvieron plantas haploides de *Q. suber*, a partir de anteras, combinando un tratamiento de temperatura a 33°C por 5 d, seguido por un cultivo a 25°C en medio MS con agar sin reguladores de crecimiento (Bueno *et al.* 1997). La propagación *in vitro* de *Q. leucotrichophora* y *Q. glauca*, se alcanzó a través del cultivo del nudo cotiledonar, del cual se obtuvieron múltiples brotes, en medios con BA sola o en combinación con GA₃ o IBA. La adición de BA a una concentración de 22.19 µM, fue la más eficaz en la inducción de múltiples brotes (Purohit *et al.* 2002). Las citocininas o sustancias tipo citocininas, solas y combinadas con auxinas o GA₃, influyen en la elongación de brotes, favorecen la

formación de callo en segmentos internodales. En explantes de *Q. suber*, cultivados en un medio WPM complementado con los micronutrientes del medio MS, vitaminas, mejorando la caulogénesis, con BA 4.5 μM y la callogénesis fue significativa en presencia de 4.5 μM de BA combinada con NAA 7 μM (El Kbiach *et al.* 2002). A partir de explantes nodales de *Q. euboica*, se desarrollaron plantas obtenidas de bellotas germinadas, obteniendo grandes índices de multiplicación. Los cultivos se inocularon en medio WPM usando diferentes concentraciones de citocininas. El mejor resultado se obtuvo con BA 4.44 μM y el enraizamiento en el mismo medio complementado con IBA 9.84 μM (Kartsonas y Papafotiou 2007). Un método eficiente de regeneración de múltiples brotes se desarrolló a partir del tubo petiolar, para *Q. semecarpifolia*, donde se usó el medio MS o WPM con BA 20 μM , alcanzando el enraizamiento de los mismos con IBA 50 o 100 μM (Tamta *et al.* 2008).

2

OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GENERALES

1. Realizar un escrutinio con las especies de encino nativas del estado de Aguascalientes con el fin de determinar cuáles son susceptibles de ser propagadas *in vitro*.
2. Desarrollar protocolos para la propagación masiva *in vitro* en aquellas especies de encino en que esto resulte factible.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Colectar material vegetal de especies de encino nativas del estado de Aguascalientes.
2. Establecer los cultivos *in vitro* de las especies seleccionadas.
3. Analizar la respuesta de yemas axilares y apicales de especies de *Quercus* nativas del estado de Aguascalientes a diferentes medios de cultivo y tratamientos diseñados para favorecer la brotación múltiple.
4. Establecer las condiciones para el enraizamiento de los brotes generados a partir de yemas de *Quercus* cultivadas *in vitro*.
5. Establecer el protocolo para la transferencia a suelo de las plántulas de *Quercus* generadas a través de la brotación *in vitro* de yemas y el enraizamiento de los brotes.
6. Determinar qué especies de encino nativas del estado de Aguascalientes son susceptibles de ser propagadas masivamente a través del cultivo de yemas axilares y apicales.

7. Generar tejido calloso a partir de embriones maduros e inmaduros de las especies de encino.
8. Evaluar el potencial embriogénico de las líneas de tejido calloso generadas en cada una de las especies y tratamientos probados.
9. Optimizar las condiciones de maduración y germinación de los embriones somáticos obtenidos.
10. Establecer las condiciones para la transferencia a suelo de las plantas generadas a través de la embriogénesis somática.
11. Determinar qué especies de encino nativas del estado de Aguascalientes son susceptibles de ser propagadas masivamente a través de la embriogénesis somática.



3. METODOLOGÍA

3.1 COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL DE LAS ESPECIES A TRABAJAR

Durante los meses de abril a noviembre, del 2007 al 2009 se realizaron salidas de campo directamente en las zonas boscosas de la Sierra Fría, y Sierra del Laurel, Cañón de Huijolotes y el Picacho, en el estado de Aguascalientes, donde se colectó el material vegetal de las especies de encino, que consta de frutos (bellotas) maduros e inmaduros, ramas y hojas jóvenes, así como estacas. En las salidas de campo se colectó material, correspondiente a las especies de encino: *Quercus castanea*, *Q. chihuahuensis*, *Q. coccolobifolia*, *Q. depressipes*, *Q. eudardii*, *Q. gentryi*, *Q. grisea*, *Q. laeta*, *Q. microphylla*, *Q. potosina*, *Q. praeco*, *Q. repanda*, *Q. resinosa*, *Q. rugosa* y *Q. sideroxylla*.

3.2 INDUCCIÓN Y MULTIPLICACIÓN DE BROTES A PARTIR DEL NUDO COTILEDONAR

Material vegetal. Se utilizaron frutos (bellotas) maduros de las especies de *Quercus* utilizadas. Las bellotas fueron separadas de la cúpula y lavadas vigorosamente con agua de la llave, después se lavaron tres veces con jabón líquido (Dermoclean) 1% (v/v) por 5 minutos y después se enjuagaron nuevamente con agua de la llave. Posteriormente se trataron con etanol al 70% (v/v) por 1 minuto, seguido por un nuevo enjuague con agua de la llave. Después se desinfectaron superficialmente con una solución (5.25% hipoclorito de sodio) al 20% (v/v) por 25 minutos y por último se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, bajo condiciones asépticas.

Una vez que el pericarpio fue removido de las semillas desinfectadas, los embriones intactos fueron tratados con una solución antioxidante y de desinfección que constaba de Plant Preservative Mixture reagent (PPMTM, Phytotechnology Lab, Shawnee Mission, KS) al 0.1% (v/v) y ácido ascórbico y cítrico al 0.01% (p/v) por 20 minutos. Los explantes (semillas) se cultivaron de manera horizontal y se germinaron en recipientes de cultivo que contenían medio MS (Murashige y Skoog 1962) con sacarosa al 3% (p/v) y solidificados

con agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) al 8% (*p/v*) y complementado con 1 g.L⁻¹ de poivnilpirrolidona (PVP), además de diferentes concentraciones (1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0 mg.L⁻¹) de benciladenina (BA) o (1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 mg.L⁻¹) cinetina CIN. Todos los medios de cultivo fueron ajustados a un pH 5.7 con NaOH 1 N, y esterilizados a 1.05 kg.cm⁻² de presión por 20 minutos. El medio MS basal sin citocininas se utilizó como control. Se probaron veinticuatro brotes por tratamiento con cuatro explantes por recipiente de cultivo (Phytotechnology Lab Product C590). Todos los cultivos se mantuvieron por dos semanas bajo condiciones de oscuridad y después se transfirieron a condiciones de luz por ocho semanas para la multiplicación de los brotes (lámparas de luz fluorescente PHILIPS, 54 μmol m⁻² s⁻¹) a 25±2°C. Los datos sobre el porcentaje de explantes que respondieron, el número de brotes por explante y la longitud de los brotes se registraron después de diez semanas.

3.3 OBTENCIÓN DE BROTES A PARTIR DE YEMAS AXILARES

Material vegetal. Se utilizaron segmentos nodales de dos diferentes fuentes: *in vitro* y *ex vitro*. *Fuente in vitro.* Se utilizaron segmentos nodales de brotes provenientes de la multiplicación a partir del nudo cotiledonar (NC). Se utilizaron brotes de por lo menos 5 cm, de los cuales se eliminaron los extremos y se obtuvieron explantes de aproximadamente 2 cm, que contenían por lo menos una yema axilar.

Fuente ex vitro. Se utilizaron segmentos de ramas colectadas de árboles directamente del campo de entre 10 y 15 cm, las cuales se usaron como material inicial. Posteriormente en el laboratorio se cortaron segmentos de 6-8 cm, que se lavaron vigorosamente con agua de la llave, después se lavaron tres veces con jabón líquido (Dermoclean) 1% (*v/v*) y dos gotas de Tween 20, por 5 minutos y después se enjuagaron nuevamente con agua de la llave. Posteriormente se trataron con etanol al 70% (*v/v*) por 30 segundos, seguido por un nuevo enjuague con agua de la llave. Después se lavaron con agua oxigenada (H₂O₂) al 3.5%, durante 30 segundos. Luego se desinfectaron superficialmente con una solución (5.25% hipoclorito de sodio) al 20% (*v/v*) por 15 minutos y por último se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, bajo condiciones asépticas. Antes del cultivo, se

eliminaron los extremos del material inicial y se cortaron explantes de aproximadamente 2 cm, los cuales se trataron con una solución antioxidante y de desinfección que constaba de PPM al 0.1% (v/v) y ácido ascórbico y cítrico al 0.01% (p/v) por 20 minutos.

Una vez obtenidos los explantes de diferente fuente, estos se colocaron horizontalmente en el medio de cultivo MS con sacarosa al 3% (p/v) y solidificados con agar al 8% (p/v) y complementado con 1 g.L⁻¹ de PVP, además de diferentes concentraciones (1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 mg.L⁻¹) de BA, CIN o 2-isopentiladenina (2iP). Todos los medios de cultivo fueron ajustados a un pH 5.7 con NaOH 1 N, y esterilizados a 1.05 kg.cm⁻² de presión por 20 minutos. El medio MS basal sin citocininas se utilizó como control. Se probaron veinticuatro brotes por tratamiento con cuatro explantes por recipiente de cultivo (Phytotechnology Lab Product C590). Todos los cultivos se mantuvieron por seis semanas bajo condiciones de luz fluorescente (54 μmol m⁻² s⁻¹) a 25±2°C. Las variables que se probaron fueron el tipo y concentración de la citocinina empleada para estimular la brotación de las yemas. Los datos sobre el porcentaje de explantes que respondieron, el número de brotes por explante y la longitud de los brotes se registraron después de seis semanas. El Factor de Multiplicación de Brotes (FMB), se calcula multiplicando el número de brotes obtenidos del NC, por el número de explantes que se pueden obtener de tal brote, por el número de brotes que se obtengan de ese explante a partir de las yemas.

3.4 ENRAIZAMIENTO DE LOS BROTES GENERADOS A PARTIR DE YEMAS AXILARES Y DEL NUDO COTILEDONAR

Enraizamiento de los brotes obtenidos de NC

Para la inducción de raíces, se siguieron dos pasos: El primer paso consistió en transferir los brotes individuales obtenidos a partir de los NC, de 2-4 cm de longitud con dos o más hojas, a un medio diluido ½ MS con sacarosa al 3% (p/v), y Phytigel (Sigma, St. Louis, MO, USA) al 0.25% (p/v) complementado con cuatro diferentes combinaciones de ácido indolbutírico (AIB): 1.0, 5.0, 10 y 20 mg.L⁻¹ y cultivados por periodos de dos o cinco días (medio de inducción del enraizamiento). Una vez inducido el enraizamiento, los brotes

se transfirieron a medio ½MS sin Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCVs), solidificado con 0.25% (p/v) de Phytigel (medio de enraizamiento). En un experimento posterior este medio de enraizamiento se complementó con carbón activado (0.3% p/v). En ambos pasos los cultivos se mantuvieron en condiciones de luz continua (lámparas de luz fluorescente PHILIPS, $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Las observaciones sobre el porcentaje de enraizamiento, número de raíces formadas por brote, el promedio de la longitud de la raíz, fueron registradas después de tres semanas de crecimiento en el medio de enraizamiento. Se inocularon veinticuatro brotes por tratamiento en recipientes de cultivo (Phytotechnology Lab Product C590), con 50 ml de medio. Se inocularon cuatro brotes por recipiente, seis recipientes por tratamiento. Los recipientes se taparon con tapas de polipropileno con membranas que permiten el intercambio gaseoso (Phytotechnology Lab Product C170). El medio ½MS sin AIB se utilizó como control en todos los experimentos.

Enraizamiento de los brotes obtenidos a partir de yemas

Para el enraizamiento de los brotes individuales generados de yemas, se utilizaron brotes de más 1.5 cm de longitud y con dos o más hojas; se siguió el procedimiento para el enraizamiento de los brotes obtenidos del NC. Sin embargo, se utilizó únicamente el tratamiento de 10.0 mg.L^{-1} de AIB, en el medio de inducción del enraizamiento durante cinco días.

3.5 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Inducción de la embriogénesis somática en embriones cigóticos

Se utilizaron frutos (bellotas) inmaduros de las especies *Q. castanea*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa* y *Q. rugosa*, las cuales se desinfectaron siguiendo el protocolo previamente descrito. Una vez que el pericarpio fue removido de las semillas desinfectadas, los embriones intactos fueron tratados con una solución antioxidante y desinfectante que constaba de PPM al 0.1% (v/v) y ácido ascórbico y cítrico al 0.01% (p/v) por 20 minutos. Los embriones cigóticos con los cotiledones separados se utilizaron como explante inicial

para la inducción de la embriogénesis somática, los cuales se cultivaron de manera horizontal en recipientes que contenían medio MS con sacarosa al 3% (*p/v*) y solidificados con agar al 8% (*p/v*), además de 1.0 g.L⁻¹ de PVP y complementado con diferentes reguladores de crecimiento: BA a 1.0 mg.L⁻¹ combinada con 1.0 y 2.0 mg.L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) o ácido 2,4-dicloro fenoxiacético (2,4-D), también se utilizó BA o 2iP a 3.0 y 4.0 mg.L⁻¹ (medio de inducción).

Inducción de la embriogénesis somática en segmentos internodales y hojas

Se utilizaron segmentos de ramas de 10 a 30 cm de largo y con hojas, las que se colectaron directamente del campo de árboles adultos, las cuales se utilizaron como material inicial. Posteriormente se usó el tratamiento de desinfección previamente descrito para el material vegetal *ex vitro*, destinado a la obtención de brotes a partir de yemas. Antes del cultivo, se eliminaron los extremos del material inicial, se cortaron entrenudos de alrededor de 2 cm, así como explantes de hoja de aproximadamente 1 cm². Los cuales se trataron con una solución antioxidante y de desinfección que constaba de PPM al 0.1% (*v/v*) y ácido ascórbico y cítrico al 0.01% (*p/v*) por 20 minutos.

Una vez obtenidos los dos tipos de explantes, estos se colocaron horizontalmente en el medio de cultivo, en el caso de las hojas se cultivaron con el envés hacia el medio. El medio fue MS con sacarosa al 3% (*p/v*) y solidificados con agar al 8% (*p/v*), además de 1.0 g.L⁻¹ de PVP y complementado con 1.0 mg.L⁻¹ de BA combinada con 2.0 mg.L⁻¹ de 2,4-D (medio de inducción).

Maduración y germinación de los embriones somáticos

Los embriones somáticos (ES) generados de los tratamientos, se transfirieron a un medio de cultivo MS con sacarosa al 5% (*p/v*), y Phytigel al 0.25% (*p/v*), carente de reguladores de crecimiento, para favorecer su maduración. Los tejidos se revisaron rutinariamente a través de microscopio con el fin de observar la diferenciación de los ES (medio de maduración).

Los ES, en estado cotiledonar tardío se separaron con cuidado del explante original y se desecaron por aeración en cajas de petri, durante 10 minutos en la campana de flujo laminar, posteriormente se sometieron a dos tratamientos: que consistían de MS complementado con sacarosa al 3% (*p/v*), y Phytigel al 0.25% (*p/v*), como medio basal con 1 mg.L⁻¹ de BA o carbón activado al 0.5% (*p/v*), en condiciones de luz durante cuatro semanas a 25±2°C (medio de germinación). El medio MS basal se utilizó como control.

Todos los medios de cultivo fueron ajustados a un pH 5.7 con NaOH 1 N, y esterilizados a 1.05 kg.cm⁻² de presión por 20 minutos. El medio MS basal sin reguladores de crecimiento se utilizó como control. Se probaron veinticuatro brotes por tratamiento con cuatro explantes por recipiente de cultivo. Todos los cultivos se mantuvieron por cuatro semanas bajo condiciones de oscuridad y después se transfirieron a condiciones de luz (lámparas de luz fluorescente PHILIPS, 54 μmol m⁻² s⁻¹) a 25±2°C por dos semanas para la diferenciación de los embriones. Después de seis semanas de cultivo se transfirieron al medio de maduración otras cuatro semanas y por último en medio fresco (medio de germinación) cuatro semanas más para su germinaran.

Conservación en frío de líneas embriogénicas

Para la conservación de líneas embriogénicas, se aislaron grupos de embriones en las fases globular a torpedo (1.5-2.5 mm), se separaron con cuidado el tejido oxidado o que presentaba necrosis, posteriormente se subcultivaron en el medio de inducción. Los cultivos se almacenaron a 4±1 °C, en condiciones de oscuridad durante uno, dos y tres meses de duración. Se evaluó el potencial embriogénico cada mes, por medio de las condiciones antes mencionadas.

3.6 ADAPTACIÓN A CONDICIONES DE INVERNADERO DE LAS PLANTAS GENERADAS A TRAVÉS DEL NUDO COTILEDONAR, YEMAS AXILARES Y DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Las plántulas generadas a partir de NC mayores a 4 cm, y las obtenidas de yemas axilares y de ES mayores a 1.5 cm de longitud y una raíz de por lo menos 4.0 cm, se retiraron del recipiente de cultivo, se eliminaron los restos de medio de cultivo, se lavaron las suavemente raíces con agua de la llave para eliminar los residuos del mismo medio de cultivo. Posteriormente se trasplantaron a macetas de plástico que contenían una mezcla de arena y peat moss (1:1) y se cubrieron con bolsas de polietileno para mantener la humedad. Las plántulas en macetas se mantuvieron en la cámara bioclimática con un fotoperiodo de 16 h ($54 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Se mantuvieron un primer periodo de un mes cubiertas con las bolsas. Después de este periodo las plántulas se aclimataron gradualmente (durante dos semanas) a la temperatura y condiciones de humedad por la apertura progresiva de la bolsa, la cual se horadó. Un último periodo de dos semanas las plántulas se mantuvieron en la cámara, pero se les retiró la bolsa definitivamente. Al cabo de dos meses en la cámara bioclimática, las plantas con crecimiento activo se trasplantaron en bolsas de polietileno y se transfirieron al invernadero. Las bolsas contenían una mezcla de arena, peat moss y tierra de encino (1:1:1). Al cabo de tres meses en el invernadero se registró el número total de plantas que sobrevivieron al proceso completo de aclimatación.



4

RESULTADOS Y
DISCUSIÓN



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESPUESTA DEL NUDO COTILEDONAR

Múltiples brotes de *Q. castanea*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa* y *Q. rugosa*, se indujeron a partir del NC de embriones cigóticos, cultivados en el medio MS complementado con BA, o CIN. El porcentaje de respuesta, número de brotes formado, y la longitud de los brotes varió significativamente con el tipo de citocinina y su concentración para cada una de las especies probadas (Cuadros 1-4). La BA fue más efectiva que la CIN en la inducción de múltiples brotes y en la promoción del crecimiento de los brotes en las especies tratadas (Fig. 3A, B, C, D y F). Las semillas de las especies desarrolladas en el medio MS carente de citocininas no formaron múltiples brotes. La concentración óptima de citocininas, requerida para inducir la mejor respuesta en el porcentaje de formación de múltiples brotes, número de brotes por explante y la longitud del brote, varía para todas las especies probadas.

El medio MS complementado con BA mostró el mayor porcentaje de explantes que formaron brotes (91.7%) para *Q. castanea* y *Q. eduardii* con 3.0 y 4.0 mg.L⁻¹, respectivamente. Para *Q. rugosa*, el mayor porcentaje de explantes que respondieron fue de 83.3% con BA (1.0 mg.L⁻¹). Para *Q. resinosa*, el mayor porcentaje de explantes que respondieron formando brotes fue del 83.3% con 3.0 mg.L⁻¹ de CIN (Cuadro 2). El presente estudio muestra que la incorporación de BA o CIN al medio fue fundamental para inducir la proliferación de múltiples brotes de un simple embrión. El promedio más alto del número de brotes fue de 6.5, 6.3, 3.8, y 3.6, con BA a 4.0, 3.0, 3.0, y 1.0 mg.L⁻¹, para *Q. eduardii*, *Q. castanea*, *Q. resinosa*, y *Q. rugosa*, respectivamente (Cuadro 1-4, fig. 4). Similares observaciones se reportaron con BA a 1.0 mg.L⁻¹ en *Q. rubra*, obteniendo 6 brotes por explante (Schwarz y Schlarbaum 1993). En las especies estudiadas, algunos embriones producen brotes en cantidad mayor a la media, hasta 20-30 nuevos brotes por explante (Fig. 4C). En el presente estudio los explantes no formaron callo basal, el cual inhibe la iniciación del brote o restringe su desarrollo, como lo reportan en *Quercus robur* donde concentraciones de BA mayores a 0.8 mg.L⁻¹ estimula el crecimiento de callo en la base del brote (Puddephat *et al.* 1997). Sin embargo, en este trabajo se observó que la exposición

prolongada a la BA (más de diez semanas) promueve la embriogénesis somática directa, en baja frecuencia para todas las especies probadas.

Cuadro 1. Efecto de la BA o CIN sobre la formación y longitud de los brotes de *Q. castanea* a partir de NC.

Especie	Citocinina	(mg.L ⁻¹)	Respuesta (%)	Brotos/explante	Longitud del brote (cm)
<i>Q. castanea</i>	BA	0.0	66.7 ± 25.8abc	0.9 ± 0.3f	3.4 ± 0.2cd
		1.0	83.3 ± 12.9a	2.0 ± 0.5cde	4.3 ± 0.1a
		2.0	83.3 ± 20.4a	2.9 ± 0.5bc	3.5 ± 0.3bcd
		3.0	91.7 ± 12.9a	6.3 ± 0.8a	3.5 ± 0.3bc
		4.0	79.2 ± 10.2ab	3.7 ± 0.6b	3.6 ± 0.2bc
		5.0	62.5 ± 13.7abc	2.5 ± 0.5cd	3.2 ± 0.2cd
	CIN	6.0	45.8 ± 18.8c	1.9 ± 1.0de	3.0 ± 0.1d
		1.0	83.3 ± 12.9a	2.4 ± 0.5cde	4.0 ± 0.4ab
		2.0	75.0 ± 0.0abc	1.6 ± 0.1def	3.4 ± 0.4cd
		3.0	66.7 ± 12.9abc	1.5 ± 0.2ef	3.4 ± 0.1cd
		4.0	50.0 ± 15.8bc	0.6 ± 0.1f	3.5 ± 0.2cd

Los datos representan la media ± DS (desviación estándar) de seis replicas con cuatro explantes por recipiente (n=24). Los valores no seguidos por la misma literal difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey (P≤0.05)

Cuadro 2. Efecto de la BA o CIN sobre la formación y longitud de los brotes de *Q. eduardii* a partir de NC.

Especie	Citocinina	(mg.L ⁻¹)	Respuesta (%)	Brotos/explante	Longitud del brote (cm)
<i>Q. eduardii</i>	BA	0.0	75.0 ± 22.4abcd	0.9 ± 0.3e	3.8 ± 0.4bc
		1.0	79.2 ± 18.8abcd	2.1 ± 0.5d	4.2 ± 0.2ab
		2.0	83.3 ± 12.9abc	2.9 ± 0.3c	4.4 ± 0.4a
		3.0	87.5 ± 13.7ab	3.7 ± 0.4b	3.5 ± 0.3bcd
		4.0	91.7 ± 12.9a	6.5 ± 0.4a	2.8 ± 0.2e
		5.0	62.5 ± 13.7bcde	3.0 ± 0.4c	2.6 ± 0.4ef
	CIN	6.0	58.3 ± 12.9cde	2.9 ± 0.2c	2.1 ± 0.1f
		1.0	66.7 ± 12.9abcde	1.7 ± 0.3d	3.4 ± 0.4cd
		2.0	87.5 ± 13.7ab	2.0 ± 0.2d	3.7 ± 0.4bcd
		3.0	54.2 ± 10.2de	1.8 ± 0.2d	3.1 ± 0.4cde
		4.0	45.8 ± 10.2e	0.8 ± 0.2e	3.1 ± 0.5de

Los datos representan la media ± DS de seis replicas con cuatro explantes por recipiente (n=24). Los valores no seguidos por la misma literal difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey (P≤0.05)

En otras especies de encinos, bajas concentraciones de BA (0.2; 0.6; 1.0 mg.L⁻¹) favorecieron la multiplicación de brotes, como se vio en *Q. robur* y *Q. petraea*, donde obtuvieron tres brotes por explante (San-Jose *et al.* 1990; Chalupa 1988; 1993; Puddephat *et al.* 1997). Kartsonas y Papafotiou (2007), así como Vieitez *et al.* (1993), reportan que el

número de brotes formados por explante fue menor (1.6 y 2.3 brotes por explante) para *Q. euboica* y *Q. rubra*, respectivamente.

Cuadro 3. Efecto de la BA o CIN sobre la formación y longitud de los brotes de *Q. resinosa* a partir de NC.

Especie	Citocinina	(mg.L ⁻¹)	Respuesta (%)	Brotes/explante	Longitud del brote (cm)
<i>Q. resinosa</i>	BA	0.0	54.2 ± 18.8bc	0.6 ± 0.3e	5.4 ± 1.0abcd
		1.0	62.5 ± 20.9abc	1.2 ± 0.3de	6.5 ± 0.3a
		2.0	66.7 ± 12.9abc	1.3 ± 0.6cde	5.3 ± 1.1abcd
		3.0	75.0 ± 15.8ab	3.8 ± 0.4a	4.0 ± 1.1de
		4.0	62.5 ± 13.7abc	2.3 ± 0.3b	3.9 ± 0.6de
		5.0	45.8 ± 10.2c	1.7 ± 0.6bcd	3.4 ± 0.5ef
	CIN	6.0	45.8 ± 18.8c	1.3 ± 0.4cde	2.1 ± 0.3f
		1.0	66.7 ± 12.9abc	1.9 ± 0.3bc	4.3 ± 0.6cde
		2.0	66.7 ± 12.9abc	1.4 ± 0.2cd	4.6 ± 1.1bcde
		3.0	83.3 ± 12.9a	2.0 ± 0.4bc	6.1 ± 0.9ab
		4.0	79.7 ± 10.2ab	1.6 ± 0.3bcd	5.9 ± 1.5abc

Los datos representan la media ± DS de seis replicas con cuatro explantes por recipiente (n=24). Los valores no seguidos por la misma literal difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey (P≤0.05)

Cuadro 4. Efecto de la BA o CIN sobre la formación y longitud de los brotes de *Q. rugosa* a partir de NC.

Especie	Citocinina	(mg.L ⁻¹)	Respuesta (%)	Brotes/explante	Longitud del brote (cm)
<i>Q. rugosa</i>	BA	0.0	54.2 ± 10.2c	0.6 ± 0.1f	3.9 ± 0.8a
		1.0	87.5 ± 13.7a	3.6 ± 0.1a	3.7 ± 0.3ab
		2.0	75.0 ± 15.8abc	2.1 ± 0.6b	3.2 ± 0.6abcd
		3.0	66.7 ± 12.9abc	1.9 ± 0.3bc	3.0 ± 0.3bcd
		4.0	62.5 ± 13.7bc	1.8 ± 0.3bcd	2.8 ± 0.5cd
		5.0	54.2 ± 10.2c	1.5 ± 0.2cde	2.7 ± 0.1cd
		6.0	54.2 ± 10.2c	1.1 ± 0.3ef	2.7 ± 0.2d
	CIN	1.0	83.3 ± 12.9ab	1.5 ± 0.4cde	3.3 ± 0.2abcd
		2.0	79.2 ± 10.2ab	1.4 ± 0.3cde	3.6 ± 0.1abc
		3.0	70.8 ± 10.2abc	1.3 ± 0.4cde	3.5 ± 0.7abcd
		4.0	66.7 ± 12.9abc	1.3 ± 0.2de	3.5 ± 0.3abcd

Los datos representan la media ± DS de seis replicas con cuatro explantes por recipiente (n=24). Los valores no seguidos por la misma literal difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey (P≤0.05)

En el cultivo con altas concentraciones de citocininas, se desarrollaron brotes con una apariencia normal, sin embargo a concentraciones mayores a 3.0 mg.L⁻¹ se redujo notablemente la presencia de hojas. Se ha reportado que los brotes generados con concentraciones de BA mayores a 1.0 mg.L⁻¹ muestran un desarrollo anormal, exhiben engrosamiento y reducción de entrenudos, presentan hojas enroscadas, vitrificación, y

callogénesis, esto en *Q. robur* (Favre y Juncker 1987; Puddephat *et al.* 1997). En el presente estudio, el número de brotes por explante se incrementó significativamente ($P < 0.001$) por el uso de altas concentraciones de BA (4.0 mg.L^{-1}) en *Q. castanea* y *Q. eduardii*. Incluso para *Q. rugosa*, donde el mayor número de brotes se observa con 1.0 mg.L^{-1} , con concentraciones mayores no se presenta vitrificación ni callogénesis, que pueden inhibir la elongación de los brotes y su supervivencia. Similar a nuestros resultados, con grandes concentraciones (5.0 mg.L^{-1}) de BA, cuando se usa sola, resulta ser efectiva para *Q. floribunda*, donde el número promedio de brotes por NC se incrementó a 11.0 brotes por explante (Purohit *et al.* 2002a). En *Q. semecarpifolia* (Tamta *et al.* 2008), con 4.5 mg.L^{-1} de BA se obtuvieron 5 brotes. En *Q. leucotrichophora* y *Q. glauca* (Purohit *et al.* 2002b), semejantes resultados se obtuvieron con altas concentraciones de BA. Sin embargo, sus resultados fueron mejores cuando la BA se combinó con ácido giberélico (GA_3). En *Q. rubra* (Vengadesan y Pijut 2009), solo esta combinación fue exitosa para obtener un máximo de 16 brotes por explante, aunque solo BA no favorece la proliferación masiva de brotes. Por esta razón, algunas especies necesitan la combinación de reguladores de crecimiento, que tienen un efecto positivo sobre el número de brotes por explante, como en *Q. suber* (Romano *et al.* 1992).

El promedio más grande en la longitud de los brotes (4.3, 4.4, 6.5 y 3.9 cm) se observó con 1.0, 2.0, 1.0 mg.L^{-1} de BA, y sin la citocinina para *Q. castanea*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa* y *Q. rugosa*, respectivamente, después de diez semanas de cultivo del explante (Cuadro 1-4). Por otro lado, la longitud de los brotes disminuyó significativamente con el incremento en la concentración de BA. Se observaron resultados semejantes con la CIN, a excepción de *Q. resinosa*, en donde la longitud de brotes se incrementó al aumentar la concentración. Estos resultados son similares a reportes anteriores, tal es el caso para *Q. euboica* (Kartsonas y Papafotiou 2007), *Q. leucotrichophora*, *Q. glauca* (Purohit *et al.* 2002b), *Q. semecarpifolia* (Tamta *et al.* 2008), y *Q. rubra* (Vengadesan y Pijut 2009). Sin embargo, en estas especies se encontró que la elongación de los brotes se favoreció con la combinación de BA con GA_3 .

Para las especies antes probadas (*Q. castanea*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa*, y *Q. rugosa*), se consideró como el mejor tratamiento el que contenía 3.0 mg.L^{-1} de BA en el medio MS, por lo que este se usó para la brotación en otras especies: *Q. chihuahuensis*, *Q. coccolobifolia*, *Q. gentryi*, *Q. grisea*, *Q. laeta*, *Q. potosina*, *Q. praeco* y *Q. sideroxyla*. (Fig. 3G, H e I) El porcentaje de respuesta, el número de brotes formado, y la longitud de los brotes varió para las diferentes especies. El porcentaje de explantes que formaron brote fue de: 70.8, 83.3, 87.5, 83.3, 75.0, 83.3, 62.5 y 91.7 %. El promedio de brotes por explante fue: 3.6, 6.3, 3.7, 4.3, 3.7, 3.2 y 6.6; y la longitud de los brotes: 4.1, 3.8, 3.1, 3.7, 3.7, 3.8, 3.6 y 2.9 cm para *Q. chihuahuensis*, *Q. coccolobifolia*, *Q. gentryi*, *Q. grisea*, *Q. laeta*, *Q. potosina*, *Q. praeco* y *Q. sideroxyla* respectivamente (Fig 4).

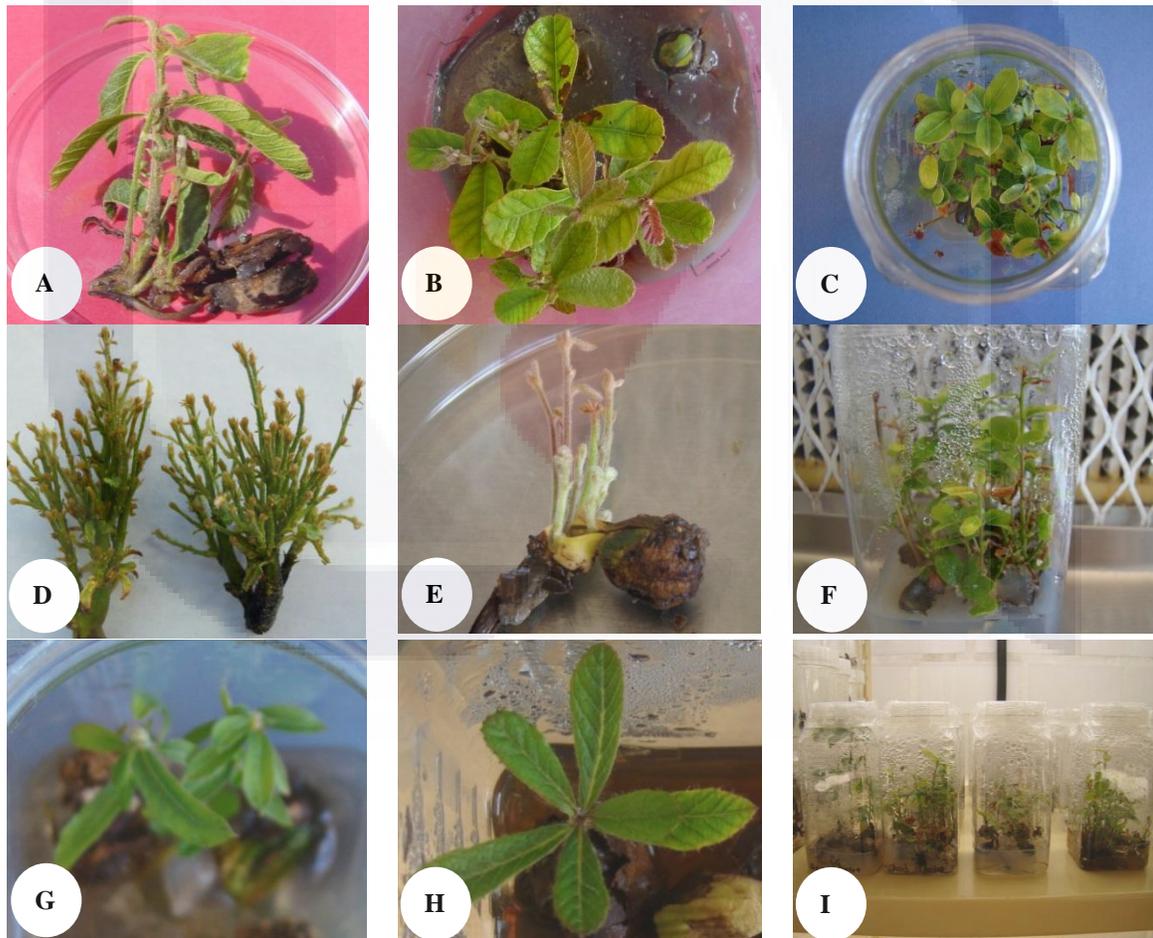


Figura 3. Propagación in vitro por medio de la inducción de brotes a partir del NC. A) *Q. resinosa*. B) *Q. rugosa*. C) *Q. eduardii*. D) *Q. rugosa*. E) *Q. resinosa*. F) *Q. castanea*. G) *Q. gentryi*. H) *Q. laeta*. I) *Quercus* spp.

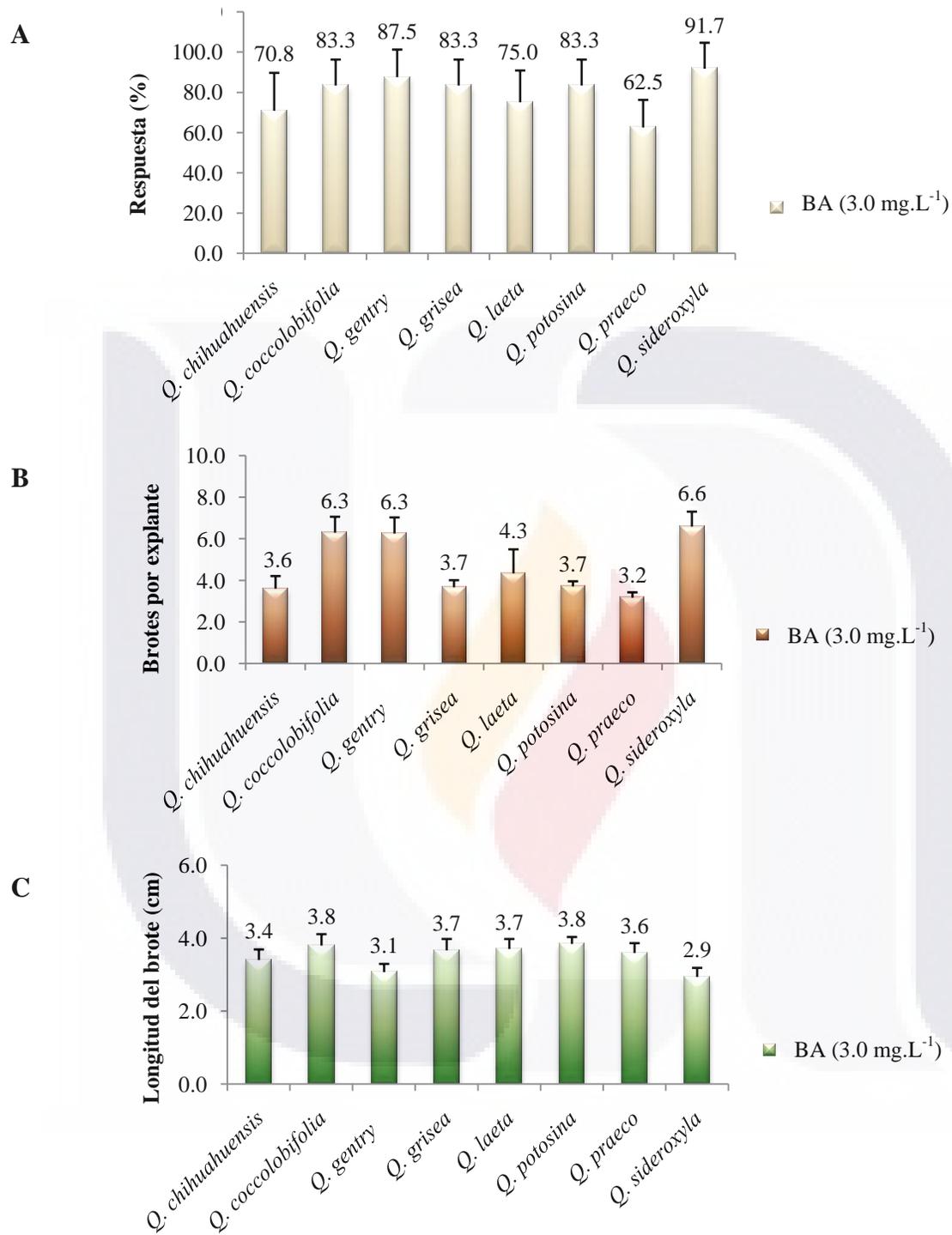


Figura 4. Respuesta del NC para las especies *Q. chihuahuensis*, *Q. coccolobifolia*, *Q. gentryi*, *Q. grisea*, *Q. laeta*, *Q. potosina*, *Q. praeco*, y *Q. sideroxylla*, en medio MS con 3.0 mg.L⁻¹ de BA. A) Porcentaje de explantes que formaron brotes. B) Número de brotes por explante. C) Longitud media de los brotes. Los datos representan la media ± DS de seis replicas con cuatro explantes por recipiente (n=24).

4.2 RESPUESTA DE YEMAS AXILARES Y APICALES

Brotes de *Q. castanea*, *Q. chihuahuensis*, *Q. eduardii*, *Q. grisea*, *Q. laeta*, *Q. potosina*, *Q. resinosa*, y *Q. rugosa*, se indujeron a partir yemas axilares de segmentos nodales obtenidos de los brotes provenientes del NC, cultivados en el medio MS complementado con BA, CIN y 2iP, siendo evidente la formación de brotes, después de tres semanas en todas las concentraciones de citocininas probadas (Fig. 6). El porcentaje de respuesta, el número de brotes formados, y la longitud de los brotes varió significativamente con el tipo y concentración de citocinina para cada una de las especies probadas (Cuadros 5-12). El porcentaje de explantes que formaron brote fue relativamente bajo, desde 4.17 % para *Q. chihuahuensis* con 4.0 mg.L⁻¹ de 2iP, hasta un 66.67% para *Q. eduardii*, *Q. laeta*, *Q. resinosa* y *Q. rugosa* con 3.0 y 2.0 mg.L⁻¹ de BA. La BA fue más efectiva que la CIN y que el 2iP en la inducción de brotes y en la promoción del crecimiento de los mismos en las especies estudiadas (Cuadros 5-12). Juncker y Favre (1994) y Puddephat *et al.* (1997), también reportan que la BA fue la mejor para la inducción de yemas axilares y la elongación de los brotes en *Q. robur*. Los explantes cultivados en el medio MS carente de citocininas no formaron brotes.

Cuadro 5. Efecto de la BA, CIN, o 2iP sobre la respuesta de yemas axilares de *Q. castanea*.

Especie	Citocinina	(mg.L ⁻¹)	Respuesta (%)	Brotes/explante	Longitud del brote (cm)	
<i>Q. castanea</i>	BA	0.0	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	
		1.0	37.50 ± 13.7	0.38 ± 0.14	2.58 ± 0.23	
		2.0	54.17 ± 10.2	0.83 ± 0.26	2.20 ± 0.16	
		3.0	62.50 ± 13.7	1.54 ± 0.58	1.84 ± 0.05	
	CIN	4.0	62.50 ± 13.7	1.17 ± 0.13	1.53 ± 0.07	
		1.0	16.67 ± 10.2	0.17 ± 0.13	2.10 ± 0.65	
		2.0	33.33 ± 12.9	0.33 ± 0.26	2.26 ± 0.16	
		3.0	41.67 ± 12.9	0.54 ± 0.19	1.96 ± 0.14	
	2iP	4.0	50.00 ± 0.00	0.63 ± 0.21	1.64 ± 0.09	
		1.0	62.50 ± 13.7	0.92 ± 0.13	2.23 ± 0.08	
		2.0	62.50 ± 13.7	0.88 ± 0.26	1.69 ± 0.09	
		3.0	41.67 ± 12.9	0.54 ± 0.19	1.58 ± 0.07	
			4.0	37.50 ± 13.7	0.50 ± 0.27	1.28 ± 0.08

Los datos representan la media ± DS de seis replicas con cuatro explantes por recipiente (n=24).

Cuadro 6. Efecto de la BA, CIN, o 2iP sobre la respuesta de yemas axilares de *Q. chihuahuensis*.

Especie	Citocinina	(mg.L ⁻¹)	Respuesta (%)	Brotos/explante	Longitud del brote (cm)
<i>Q. chihuahuensis</i>	BA	0.0	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
		1.0	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
		2.0	33.33 ± 12.9	0.50 ± 0.21	1.54 ± 0.19
		3.0	50.00 ± 0.00	0.88 ± 0.26	1.64 ± 0.13
		4.0	41.67 ± 12.9	0.58 ± 0.24	1.55 ± 0.09
	CIN	1.0	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
		2.0	33.33 ± 12.9	0.33 ± 0.18	1.56 ± 0.20
		3.0	37.50 ± 13.7	0.50 ± 0.16	1.50 ± 0.25
		4.0	4.17 ± 10.2	0.04 ± 0.02	0.32 ± 0.18
		2iP	1.0	37.50 ± 13.7	0.46 ± 0.20
	2.0		29.17 ± 18.8	0.33 ± 0.18	1.27 ± 0.54
	3.0		8.33 ± 12.9	0.08 ± 0.03	0.62 ± 0.26
	4.0		4.17 ± 10.2	0.04 ± 0.02	0.28 ± 0.09

Los datos representan la media ± DS de seis replicas con cuatro explantes por recipiente (n=24).

Cuadro 7. Efecto de la BA, CIN, o 2iP sobre la respuesta de yemas axilares de *Q. eduardii*.

Especie	Citocinina	(mg.L ⁻¹)	Respuesta (%)	Brotos/explante	Longitud del brote (cm)
<i>Q. eduardii</i>	BA	0.0	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
		1.0	33.33 ± 12.9	0.33 ± 0.26	2.75 ± 0.19
		2.0	54.17 ± 10.2	0.79 ± 0.29	2.53 ± 0.06
		3.0	66.67 ± 12.9	1.71 ± 0.29	2.20 ± 0.05
		4.0	58.33 ± 12.9	1.13 ± 0.26	1.76 ± 0.13
	CIN	1.0	16.67 ± 10.2	0.17 ± 0.20	1.65 ± 1.28
		2.0	37.50 ± 13.7	0.38 ± 0.26	2.34 ± 0.05
		3.0	45.83 ± 10.2	0.58 ± 0.13	1.93 ± 0.12
		4.0	62.50 ± 13.7	0.88 ± 0.26	1.96 ± 0.09
		2iP	1.0	20.83 ± 10.2	0.21 ± 0.19
	2.0		62.50 ± 20.9	0.92 ± 0.34	1.73 ± 0.04
	3.0		41.67 ± 12.9	0.63 ± 0.21	1.69 ± 0.07
	4.0		41.67 ± 12.9	0.58 ± 0.26	1.34 ± 0.10

Los datos representan la media ± DS de seis replicas con cuatro explantes por recipiente (n=24).

En el presente trabajo, las yemas apicales muestran nulas tasas de proliferación, en todas las especies probadas, debido a la necrosis de la parte apical de los explantes (datos no mostrados). En otros reportes, obtuvieron diferentes resultados con explantes nodales que se relaciona con el diferente estado fisiológico de las yemas en diferentes regiones del tallo para el caso de *Quercus robur* (Vieitez *et al.* 1985). El presente estudio muestra que la incorporación de BA o CIN al medio fue esencial para inducir la proliferación de brotes de un segmento nodal (Fig 6). El promedio más alto fue de 1.71 brotes por explante, con BA a 3.0 mg.L⁻¹, para *Q. eduardii* y el más bajo fue de 0.04 brotes por explante, con 4.0 mg.L⁻¹ de 2iP, para *Q. chihuahuensis*, (Cuadro 6-12). En el caso de *Q. eduardii*, algunos explantes

producen más de 4 brotes por explante. En otras especies de encinos, bajas concentraciones de BA (0.2; 0.6; 1.0 mg.L⁻¹) favorecieron la multiplicación de brotes, como se vio en *Q. robur* y *Q. petraea*, donde obtuvieron 3 brotes por explante (San-Jose *et al.* 1990; Chalupa 1988; 1993; Puddephat *et al.* 1997).

Cuadro 8. Efecto de la BA, CIN, o 2iP sobre la respuesta de yemas axilares de *Q. grisea*.

Especie	Citocinina	(mg.L ⁻¹)	Respuesta (%)	Brotes/explante	Longitud del brote (cm)
<i>Q. grisea</i>	BA	0.0	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
		1.0	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
		2.0	29.17 ± 10.2	0.29 ± 0.19	1.69 ± 0.19
		3.0	45.83 ± 10.2	0.63 ± 0.21	1.45 ± 0.08
		4.0	37.50 ± 13.7	0.46 ± 0.29	1.47 ± 0.11
	CIN	1.0	37.50 ± 13.7	0.54 ± 0.29	1.41 ± 0.05
		2.0	41.67 ± 12.9	0.50 ± 0.16	1.56 ± 0.20
		3.0	33.33 ± 12.9	0.46 ± 0.10	1.57 ± 0.16
		4.0	16.67 ± 10.2	0.17 ± 0.10	1.15 ± 0.86
	2iP	1.0	37.50 ± 13.7	0.46 ± 0.20	1.68 ± 0.18
		2.0	29.17 ± 18.8	0.33 ± 0.19	1.28 ± 0.43
		3.0	25.00 ± 12.9	0.29 ± 0.18	1.36 ± 0.68
		4.0	12.50 ± 10.2	0.13 ± 0.09	0.73 ± 0.52

Los datos representan la media ± DS de seis replicas con cuatro explantes por recipiente (n=24).

Cuadro 9. Efecto de la BA, CIN, o 2iP sobre la respuesta de yemas axilares de *Q. laeta*.

Especie	Citocinina	(mg.L ⁻¹)	Respuesta (%)	Brotes/explante	Longitud del brote (cm)
<i>Q. laeta</i>	BA	0.0	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
		1.0	16.67 ± 10.2	0.17 ± 0.08	2.55 ± 1.25
		2.0	62.50 ± 13.7	0.88 ± 0.14	2.48 ± 0.04
		3.0	66.67 ± 12.9	1.08 ± 0.26	2.43 ± 0.04
		4.0	54.17 ± 10.2	0.83 ± 0.20	2.38 ± 0.08
	CIN	1.0	62.50 ± 13.7	0.92 ± 0.30	2.63 ± 0.09
		2.0	50.00 ± 15.8	0.75 ± 0.36	2.52 ± 0.04
		3.0	50.00 ± 0.00	0.63 ± 0.21	2.39 ± 0.08
		4.0	33.33 ± 12.9	0.42 ± 0.19	2.30 ± 0.07
	2iP	1.0	58.33 ± 12.9	0.88 ± 0.21	2.57 ± 0.10
		2.0	62.50 ± 13.7	0.83 ± 0.20	2.61 ± 0.05
		3.0	41.67 ± 12.9	0.63 ± 0.21	2.49 ± 0.03
		4.0	37.50 ± 13.7	0.46 ± 0.22	2.39 ± 0.05

Los datos representan la media ± DS de seis replicas con cuatro explantes por recipiente (n=24).

El promedio más grande de la longitud de los brotes, se observó regularmente con las concentraciones más bajas (1.0 o 2.0 mg.L⁻¹) de las citocininas empleadas (Cuadro 5-12). La longitud de los brotes disminuyó significativamente con el incremento en la

concentración de la citocinina utilizada, de tal forma que con las concentraciones más altas de citocininas se obtuvieron los brotes de menor tamaño. Es sabido que en encinos, el incremento de BA usada para la proliferación de brotes, disminuye su elongación (Chalupa 1988).

Cuadro 10. Efecto de la BA, CIN, o 2iP sobre la respuesta de yemas axilares de *Q. potosina*

Especie	Citocinina	(mg.L ⁻¹)	Respuesta (%)	Brotes/explante	Longitud del brote (cm)
<i>Q. potosina</i>	BA	0.0	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
		1.0	12.50 ± 10.2	0.13 ± 0.08	2.00 ± 0.93
		2.0	54.17 ± 10.2	0.83 ± 0.26	2.74 ± 0.06
		3.0	58.33 ± 12.9	1.00 ± 0.22	2.51 ± 0.03
		4.0	50.00 ± 15.8	0.79 ± 0.25	2.46 ± 0.05
	CIN	1.0	41.67 ± 18.7	0.67 ± 0.27	2.35 ± 1.15
		2.0	41.67 ± 12.9	0.58 ± 0.23	2.46 ± 0.09
		3.0	41.67 ± 12.9	0.50 ± 0.16	2.38 ± 0.06
		4.0	37.50 ± 13.7	0.46 ± 0.25	2.25 ± 0.04
	2iP	1.0	62.50 ± 13.7	0.96 ± 0.19	2.62 ± 0.06
		2.0	66.67 ± 12.9	0.92 ± 0.26	2.62 ± 0.06
		3.0	37.50 ± 13.7	0.58 ± 0.26	2.35 ± 0.05
		4.0	33.33 ± 12.9	0.42 ± 0.18	2.29 ± 0.07

Los datos representan la media ± DS de seis replicas con cuatro explantes por recipiente (n=24).

Cuadro 11. Efecto de la BA, CIN, o 2iP sobre la respuesta de yemas axilares de *Q. resinosa*.

Especie	Citocinina	(mg.L ⁻¹)	Respuesta (%)	Brotes/explante	Longitud del brote (cm)
<i>Q. resinosa</i>	BA	0.0	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
		1.0	33.33 ± 12.9	0.38 ± 0.18	3.38 ± 0.12
		2.0	62.50 ± 13.7	1.08 ± 0.34	2.95 ± 0.11
		3.0	66.67 ± 12.9	1.17 ± 0.30	2.78 ± 0.10
		4.0	41.67 ± 12.9	0.54 ± 0.25	2.49 ± 0.12
	CIN	1.0	58.33 ± 12.9	0.92 ± 0.34	2.87 ± 0.04
		2.0	54.17 ± 10.2	0.67 ± 0.20	2.87 ± 0.07
		3.0	33.33 ± 12.9	0.50 ± 0.22	2.63 ± 0.09
		4.0	20.83 ± 10.2	0.21 ± 0.09	1.69 ± 0.74
	2iP	1.0	37.50 ± 13.7	0.46 ± 0.19	2.32 ± 0.08
		2.0	62.50 ± 20.9	0.88 ± 0.31	1.35 ± 0.53
		3.0	41.67 ± 12.9	0.63 ± 0.14	0.61 ± 0.29
		4.0	41.67 ± 12.9	0.50 ± 0.22	1.89 ± 0.05

Los datos representan la media ± DS de seis replicas con cuatro explantes por recipiente (n=24).

Cuadro 12. Efecto de la BA, CIN, o 2iP sobre la respuesta de yemas axilares de *Q. rugosa*.

Especie	Citocinina	(mg.L ⁻¹)	Respuesta (%)	Brotos/explante	Longitud del brote (cm)
<i>Q. rugosa</i>	BA	0.0	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
		1.0	41.67 ± 12.9	0.50 ± 0.22	3.14 ± 0.06
		2.0	66.67 ± 12.9	1.21 ± 0.33	2.86 ± 0.04
		3.0	62.50 ± 13.7	1.04 ± 0.19	2.65 ± 0.10
		4.0	58.33 ± 12.9	0.92 ± 0.20	2.64 ± 0.05
	CIN	1.0	62.50 ± 13.7	0.96 ± 0.29	2.75 ± 0.05
		2.0	50.00 ± 0.00	0.67 ± 0.26	2.66 ± 0.10
		3.0	45.83 ± 10.2	0.58 ± 0.13	2.54 ± 0.05
		4.0	37.50 ± 13.7	0.46 ± 0.19	2.48 ± 0.06
	2iP	1.0	58.33 ± 12.9	0.88 ± 0.21	2.65 ± 0.09
		2.0	54.17 ± 18.8	0.79 ± 0.29	2.63 ± 0.01
		3.0	41.67 ± 12.9	0.63 ± 0.21	2.53 ± 0.12
		4.0	41.67 ± 12.9	0.58 ± 0.26	2.38 ± 0.09

Los datos representan la media ± DS de seis replicas con cuatro explantes por recipiente (n=24).

Para las especies antes probadas (*Q. castanea*, *Q. chihuahuensis*, *Q. eduardii*, *Q. grisea*, *Q. laeta*, *Q. potosina*, *Q. resinosa*, y *Q. rugosa*), se consideró como el mejor tratamiento el que contenía 3.0 mg.L⁻¹ de BA, en el medio MS, por lo que este se usó para la brotación de yemas axilares a partir de segmentos nodales obtenidos de ramas provenientes árboles adultos de las especies: *Q. depressipes*, *Q. eduardii*, *Q. microphylla* y *Q. repanda* (Fig. 6). El porcentaje de respuesta, el número de brotes formado, y la longitud de los brotes varió para las diferentes especies. El porcentaje de explantes que formaron brote fue mejor que en las especies donde la fuente del explante, fueron los brotes obtenidos del NC, esto en el caso de *Q. eduardii* el cual se probaron las dos fuentes de explante. Se obtuvo respuesta de 62.5, 75.0, 70.8 y 54.2, % para *Q. depressipes*, *Q. eduardii*, *Q. microphylla* y *Q. repanda* respectivamente (Fig 5A). Cabe mencionar que en este experimento el tratamiento de limpieza y desinfección del explante debe ser muy riguroso, ya que disminuyendo los tiempos u omitiendo un paso, la contaminación en el cultivo es drástica. Por el contrario cuando se incrementan el tiempo, la respuesta de los explantes se ve muy reducida. El promedio de brotes por explante fue: 1.75, 1.33, 2.04 y 1.38; y la longitud de los brotes: 2.6, 2.8, 2.6 y 2.7 cm para *Q. depressipes*, *Q. eduardii*, *Q. microphylla* y *Q. repanda* respectivamente (Fig 5B y C).

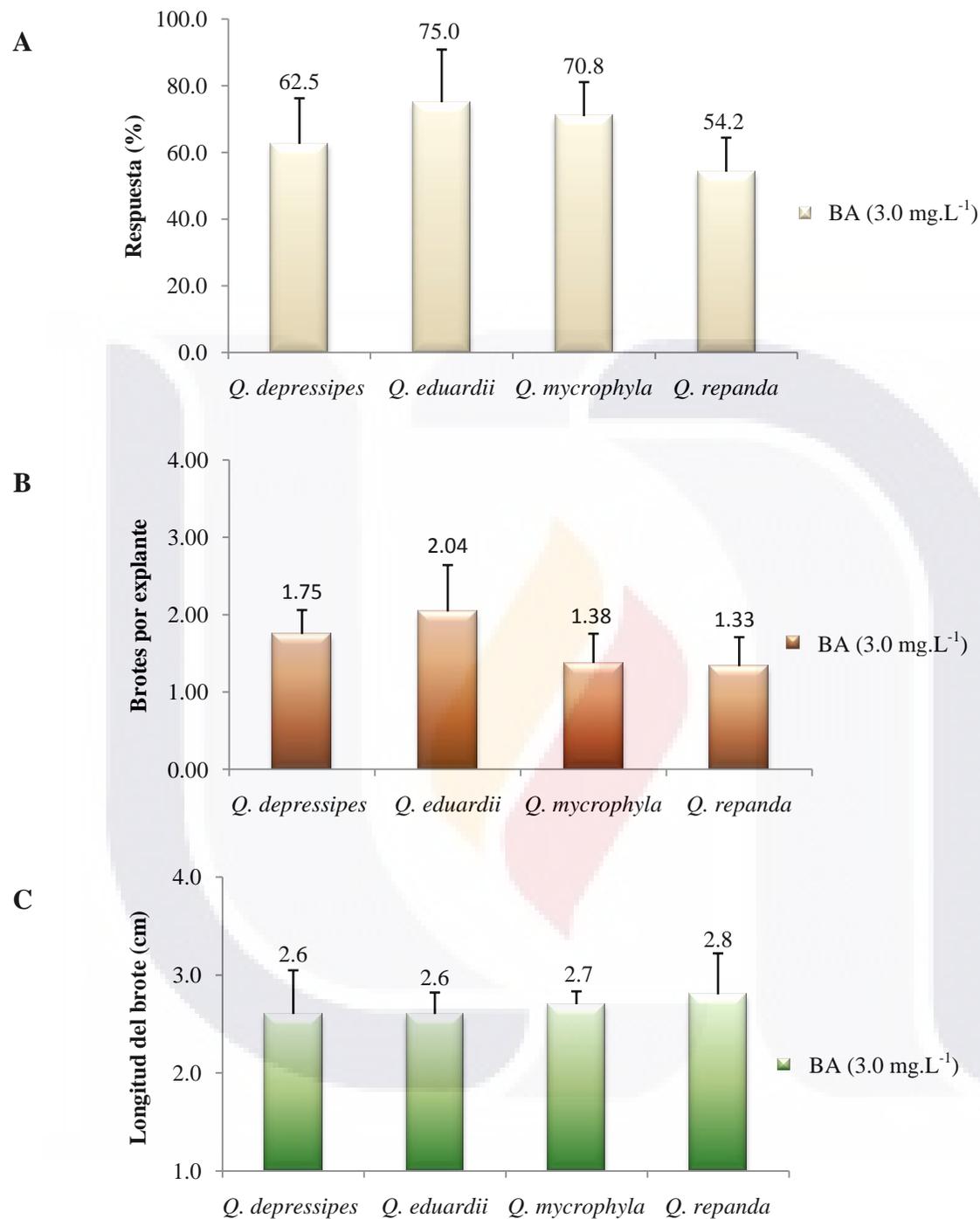


Figura 5. Respuesta de yemas axilares de explantes obtenidos de árboles adultos de las especies *Q. depressipes*, *Q. eduardii*, *Q. microphylla*, y *Q. repanda*, en medio MS con 3.0 mg.L⁻¹ de BA. A) Porcentaje de explantes que formaron brotes. B) Número de brotes por explante. C) Longitud media de los brotes. Los datos representan la media ± DS de seis replicas con cuatro explantes por recipiente (n=24).

En el presente estudio, el número de brotes por explante se incrementó significativamente ($P < 0.05$) por el uso de altas concentraciones de BA (3.0 mg.L^{-1}) en todas las especies estudiadas, con excepción de *Q. rugosa* que su mejor respuesta fue con 2.0 mg.L^{-1} de BA. Los brotes obtenidos en todos los tratamientos probados y de las dos fuentes del explante, tenían una morfología normal. Sin embargo los brotes obtenidos a concentraciones mayores (4.0 mg.L^{-1}) de las citocininas empleadas, por lo general exhibían necrosis, hojas pequeñas o callogénesis más frecuente en los extremos o en las yemas de los explantes (Fig. 6D, G, H, I). Se ha reportado que los brotes generados con concentraciones mayores a 1.0 mg.L^{-1} de BA, se observa un desarrollo anormal, los brotes exhiben engrosamiento y reducción de entrenudos, presentan hojas enroscadas, vitrificación, y callogénesis, esto en *Q. robur* (Favre y Juncker 1987; Puddephat *et al.* 1997).

La posición de explante fue muy importante, ya que en experimentos previos donde su cultivo fue de manera vertical, estos exhibían necrosis en los extremos del explante en todos los casos (datos no mostrados). Por lo cual, los resultados mostrados son de explantes cultivados de manera horizontal en el medio de cultivo. Vieitez *et al.* (1994) reportaron para *Q. robur*, que la posición horizontal del explante promueve el desarrollo de brotes vigorosos. Por otro lado al cultivar nuevamente los brotes obtenidos para su multiplicación, la mayoría sufría necrosis, por lo que es recomendable después de su obtención pasarlos a su enraizamiento.

Aunque el número de brotes por explante fue relativamente bajo para todas las especies, comparado con el número de brotes obtenidos del NC. Si consideramos el FMB, obtendríamos un número substancial de plantas. En el caso de los explantes que provienen de brotes del NC, en los mejores tratamientos se formaron hasta 6.5 brotes por semilla y de cada brote se pueden obtener hasta 3 segmentos nodales como explante, estos por el número de brotes obtenidos a partir de las yemas axilares, entonces el número de brotes, obtenidos de una semilla se incrementaría significativamente. A diferencia de los brotes obtenidos del NC, los obtenidos directamente de yemas siempre presentaban hojas lo que es trascendental para la supervivencia de la plántula.

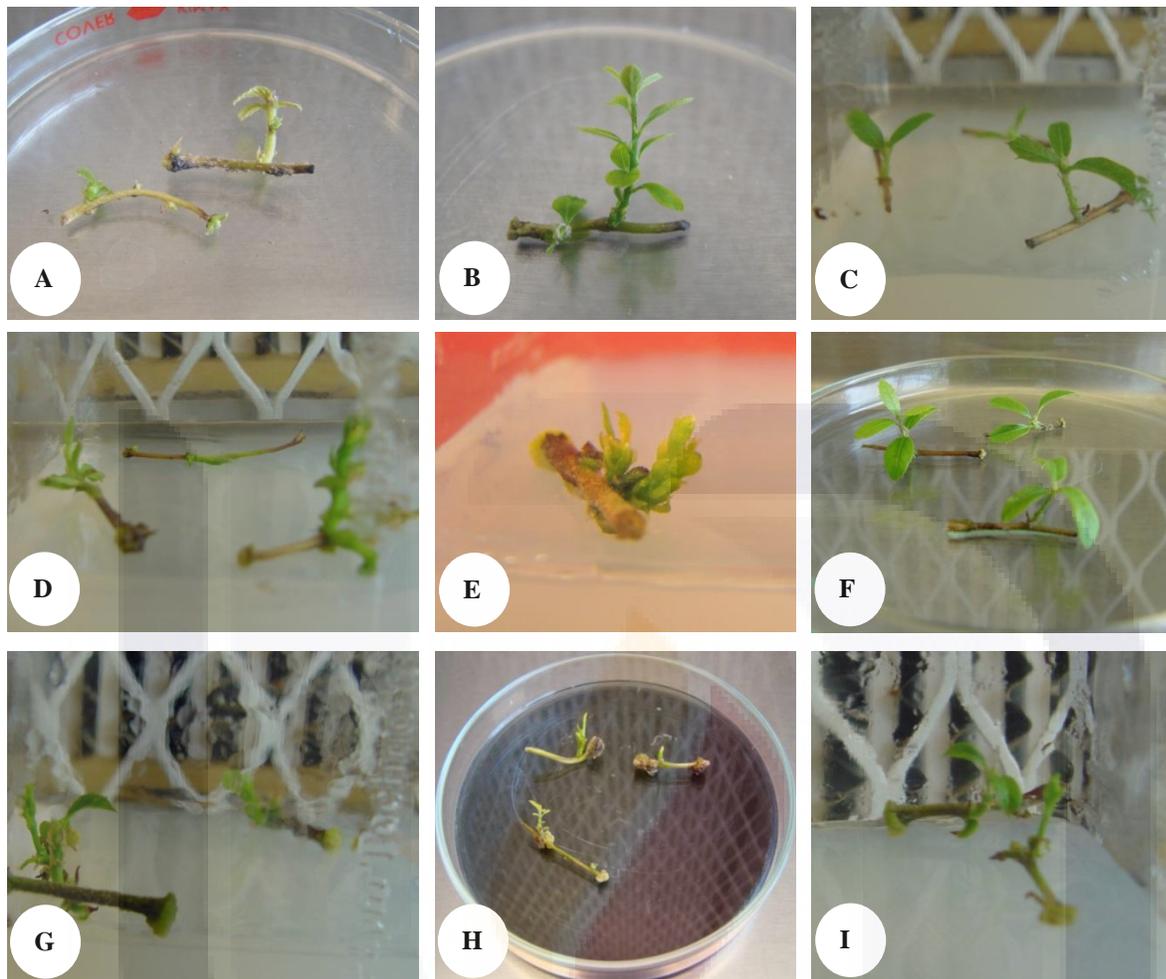


Figura 6. Brotes de yemas axilares. A) *Q. resinosa*. B) *Q. eduardii*, C) *Q. castanea* D) *Q. rugosa*. E) *Q. praeco* F) *Q. eduardii*. G) *Q. potosina*. H) *Q. microphylla*. I) *Q. potosina*.

4.3 ENRAIZAMIENTO DE BROTES

El porcentaje de enraizamiento de los brotes fue afectado significativamente ($P < 0.05$), tanto por la concentración de AIB y el periodo de aplicación. (Cuadro 13-16). Para todas las especies estudiadas, se alcanzaron tasa aceptables de enraizamiento, gracias a la optimización de la duración de los tratamientos con AIB (2 o excepcionalmente cinco días). Después de estos periodos, se alcanzó el enraizamiento de los brotes generados *in vitro* (2-4 cm de largo) en el medio $\frac{1}{2}$ MS, complementado con AIB (Cuadro 13-16). La iniciación del enraizamiento sobre los brotes ocurrió después de dos semanas sobre el medio de enraizamiento (Fig. 10). No se observó la formación de raíces cuando los brotes se cultivaron inicialmente en el medio que carecía de la auxina, aún después de treinta días de cultivo.

Cuadro 13. Efecto de la concentración de AIB (mg.L^{-1}) y el periodo de aplicación (días), sobre el porcentaje de enraizamiento, número de raíces y longitud de la raíz de *Q. castanea*.

Especie	AIB (mg.L^{-1})	Tiempo (d)	Enraizamiento (%)	Raíces/brote	Longitud de la raíz (cm)
<i>Q. castanea</i>	0.0	2	0.0 ± 0.0d	0.0 ± 0.0c	0.0 ± 0.0e
		5	0.0 ± 0.0d	0.0 ± 0.0c	0.0 ± 0.0e
	1.0	2	33.3 ± 14.4cd	0.3 ± 0.1bc	1.2 ± 0.2d
		5	41.7 ± 14.4c	0.6 ± 0.3bc	1.7 ± 0.4cd
	5.0	2	58.3 ± 14.4bc	1.1 ± 0.4bc	1.8 ± 0.1c
		5	66.7 ± 14.4abc	1.4 ± 0.5bc	2.4 ± 0.3b
	10.0	2	91.7 ± 14.4ab	4.7 ± 0.5a	3.0 ± 0.3a
		5	100. ± 0.0a	6.3 ± 1.2a	2.4 ± 0.1b
	20.0	2	66.7 ± 14.4abc ^c	2.3 ± 0.3b	2.2 ± 0.2bc
		5	91.7 ± 14.4ab ^c	5.1 ± 1.7a	1.9 ± 0.2bc

Los datos representan la media ± DS de seis replicas con cuatro explantes por recipiente (n=24). Los valores no seguidos por la misma literal difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). ^c formación de callo basal.

En el presente estudio, se observó que los brotes tratados con 10.0 mg.L^{-1} de AIB por cinco días y después de transferirlos al medio $\frac{1}{2}$ MS sin reguladores de crecimiento muestran la frecuencia más alta de rizogénesis (100, 100, 66.7 y 83.3 %), con el máximo de número de raíces (6.3, 5.6, 2.6 y 2.8 raíces por brote) y una longitud en promedio de 3.0, 3.0, 2.3 y 2.1 cm para *Q. castanea*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa*, y *Q. rugosa*, respectivamente. En adición 20.0 mg.L^{-1} de AIB se encontró incrementa el número de raíces formadas y

reduce el tiempo de su emergencia. De las cuatro especies probadas, *Q. castanea* y *Q. eduardii* muestran los mejores resultados comparados con *Q. resinosa* y *Q. rugosa* (Cuadro 13-16). Concentraciones de AIB menores a 5.0 mg.L⁻¹ muestran una reducción significativa en la respuesta al enraizamiento. Aunque todos los tratamientos con AIB resultan en la inducción del enraizamiento, los tratamientos con 20.0 mg.L⁻¹ de IBA por dos a cinco días, así como los tratamientos con 10.0 mg.L⁻¹ por cinco días, resultaron con un alto porcentaje de enraizamiento, los brotes producían raíces con la formación de callo basal, que no es deseable (Cuadro 13-16).

Cuadro 14. Efecto de la concentración de AIB (mg.L⁻¹) y el periodo de aplicación (días), sobre el porcentaje de enraizamiento, número de raíces y longitud de la raíz de *Q. eduardii*.

Especie	AIB (mg.L ⁻¹)	Tiempo (d)	Enraizamiento (%)	Raíces/brote	Longitud de la raíz (cm)
<i>Q. eduardii</i>	0.0	2	0.0 ± 0.0d	0.0 ± 0.0c	0.0 ± 0.0d
		5	0.0 ± 0.0d	0.0 ± 0.0c	0.0 ± 0.0d
	1.0	2	25 ± 0.0 cd	0.4 ± 0.1c	0.9 ± 0.1cd
		5	33.3 ± 14.4bcd	0.8 ± 0.8c	1.7 ± 0.8bc
	5.0	2	41.7 ± 14.4bcd	1.0 ± 0.3bc	1.8 ± 0.2bc
		5	75.0 ± 25.0ab ^c	3.3 ± 2.4abc	2.4 ± 0.0ab
	10.0	2	91.7 ± 14.4a	5.1 ± 1.5ab	3.0 ± 0.6a
		5	100. ± 0.0a ^c	5.6 ± 2.1a	1.6 ± 0.2bc
	20.0	2	58.3 ± 14.4abc ^c	1.6 ± 0.4abc	2.0 ± 0.1abc
		5	83.3 ± 28.9ab ^c	5.3 ± 2.8a	1.8 ± 0.6bc

Los datos representan la media ± DS de seis replicas con cuatro explantes por recipiente (n=24). Los valores no seguidos por la misma literal difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey (P≤0.05). ^c formación de callo basal.

Aunque la formación de callo en la base de los brotes, no disminuye la respuesta del enraizamiento *in vitro*, se considera que este tejido es perjudicial para la supervivencia subsecuente de las plántulas durante la aclimatación, ya que las conexiones vasculares funcionales entre la raíz y el tallo tienen que ser establecidas en el enraizamiento *in vitro* (Zimmermann 1988). De tal forma que si el tejido calloso prolifera, el establecimiento de las conexiones vasculares se rezaga, o incluso se interrumpe, privando a la plántula de los suministros adecuados de nutrientes o factores de crecimiento, viéndose así comprometida su supervivencia. Estos resultados son consistentes con estudios previos de enraizamiento de brotes de encino, donde grandes concentraciones o periodos prolongados de exposición al AIB afecta el enraizamiento, en *Q. suber* (Manzanera y Pardos 1990), *Q. robur*

(Puddephat *et al.* 1999), *Q. floribunda* (Purohit *et al.* 2002a), *Q. leucotrichophora*, *Q. glauca* (Purohit *et al.* 2002b), *Q. semecarpifolia* (Tamta *et al.* 2008), y *Q. rubra* (Vengadesan y Pijut 2009). Esto contrasta con lo encontrado para *Q. euboica* (Kartsonas y Papafotiou 2007), donde la continua presencia de la auxina en el medio de enraizamiento no afecta el número de raíces ni su longitud. En este estudio se utilizaron grandes concentraciones de citocininas en la proliferación de brotes, por los que la formación de callo basal, puede ser también promovida por la interacción con la auxina.

Cuadro 15 Efecto de la concentración de AIB (mg.L⁻¹) y el periodo de aplicación (días), sobre el porcentaje de enraizamiento, número de raíces y longitud de la raíz de *Q. resinosa*.

Especie	AIB (mg.L ⁻¹)	Tiempo (d)	Enraizamiento (%)	Raíces/brote	Longitud de la raíz (cm)
<i>Q. resinosa</i>	0.0	2	0.0 ± 0.0b	0.0 ± 0.0d	0.0 ± 0.0d
		5	0.0 ± 0.0b	0.0 ± 0.0d	0.0 ± 0.0d
	1.0	2	33.3 ± 14.4ab	0.8 ± 0.3cd	1.1 ± 0.3c
		5	41.7 ± 14.4ab	0.7 ± 0.4cd	2.0 ± 0.4abc
	5.0	2	33.3 ± 14.4ab	0.8 ± 0.4bcd	1.4 ± 0.2bc
		5	41.7 ± 14.4ab	1.3 ± 0.5abcd	2.0 ± 0.3ab
	10.0	2	41.7 ± 14.4ab	1.8 ± 0.6abc	2.0 ± 0.4abc
		5	66.7 ± 14.4a	2.6 ± 0.6a	2.3 ± 0.1ab
	20.0	2	50.0 ± 25.0a ^c	1.7 ± 1.1abc	2.2 ± 0.6bc
		5	66.7 ± 14.4a ^c	2.3 ± 0.6ab	2.4 ± 0.1a

Los datos representan la media ± DS de seis replicas con cuatro explantes por recipiente (n=24). Los valores no seguidos por la misma literal difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey (P≤0.05). ^c formación de callo basal.

El tratamiento más efectivo para la inducción del enraizamiento sin la formación de callo basal fue el uso del medio ½ MS, complementado con 10.0 mg.L⁻¹ de AIB por un periodo de dos días para *Q. castanea* y *Q. eduardii* (encinos rojos) y cinco días para *Q. resinosa* y *Q. rugosa* (encinos blancos), seguido por la transferencia al medio ½MS basal. Esto fue suficiente para permitir la formación de raíces y la reducción del riesgo de daño durante la subsecuente transferencia a suelo.

En pruebas preliminares de enraizamiento, llevadas a cabo con brotes mantenidos en condiciones de oscuridad, aún por periodos de dos o cinco días y diferentes concentraciones (1.0, 5.0, 10.0 y 20.0 mg.L⁻¹) de AIB, AIA o ANA se producía la senescencia y necrosis del brote, tal como lo ha reportado Sánchez *et al.* (1996), para *Q.*

robur y *Q. rubra*. Caso contrario para *Q. alba*, *Q. bicolor* y *Q. rubra* el enraizamiento se incrementó siempre por un período inicial de cinco días de oscuridad (Vieitez, *et al.* 2009). Por otro lado, los brotes tratados con AIA y ANA aún en condiciones de luz continua no inducían la formación de raíces, por el contrario promovían la formación de tejido calloso en la base del brote (datos no mostrados). Por esta razón, en los subsecuentes experimentos los brotes fueron tratados solo con AIB por periodos de dos o cinco días para inducir el enraizamiento.

Cuadro 16. Efecto de la concentración de AIB (mg.L⁻¹) y el periodo de aplicación (días), sobre el porcentaje de enraizamiento, número de raíces y longitud de la raíz de *Q. rugosa*.

Especie	AIB (mg.L ⁻¹)	Tiempo (d)	Enraizamiento (%)	Raíces/brote	Longitud de la raíz (cm)
<i>Q. rugosa</i>	0.0	2	0.0 ± 0.0d	0.0 ± 0.0f	0.0 ± 0.0d
		5	0.0 ± 0.0d	0.0 ± 0.0f	0.0 ± 0.0d
	1.0	2	25.0 ± 0.0cd	0.3 ± 0.1ef	1.1 ± 0.2c
		5	33.3 ± 14.4c	0.6 ± 0.1ef	1.1 ± 0.1c
	5.0	2	33.3 ± 14.4c	0.7 ± 0.1def	1.0 ± 0.1c
		5	41.7 ± 14.4bc	0.9 ± 0.4cde	1.9 ± 0.3a
	10.0	2	41.7 ± 14.4bc	1.4 ± 0.4bcd	1.3 ± 0.2bc
		5	83.3 ± 14.4a	2.8 ± 0.4a	2.1 ± 0.3a
	20.0	2	50.0 ± 0.0bc ^c	1.5 ± 0.0bc	1.4 ± 0.2bc
		5	66.7 ± 14.4ab ^c	1.8 ± 0.5b	1.8 ± 0.1ab

Los datos representan la media ± DS de seis replicas con cuatro explantes por recipiente (n=24). Los valores no seguidos por la misma literal difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey (P≤0.05). ^c formación de callo basal.

En experimentos subsecuentes de enraizamiento, el uso adicional de carbón activado (0.3% *p/v*) en el medio de enraizamiento no mejoró el porcentaje de brotes que forman raíces, pero incrementó el número de raíces por brote y la longitud de las mismas. Además, los brotes se observan más vigorosos con más hojas y más raíces secundarias. Debido a que el carbón activado absorbe el exceso de RCVs, así como las sustancias perjudiciales que pueden ser liberadas por el mismo tejido o por el medio, además de proporcionar un oscurecimiento parcial del ambiente (Pan y van Staden 1998). Por otro lado el uso de tapas que permitían el intercambio gaseoso en los recipientes de cultivo en esta etapa es un importante factor. En experimentos previos en los que no se utilizó este tipo de tapas, se observó un escaso desarrollo, senescencia y la abscisión de las hojas.

Para las especies antes probadas (*Q. castanea*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa*, y *Q. rugosa*), se consideró como el mejor tratamiento para la inducción del enraizamiento, el que contenía 10.0 mg.L^{-1} de AIB, en el medio MS diluido durante 5 días, por lo que este se usó para el enraizamiento de los brotes obtenidos del NC de las especies *Q. chihuahuensis*, *Q. coccolobifolia*, *Q. gentryi*, *Q. grisea*, *Q. laeta*, *Q. potosina*, *Q. praeco*, y *Q. sideroxyla*, donde se obtuvo respuesta de 62.5, 87.5, 91.7, 62.5, 66.7, 70.8, 66.7 y 95.8 % y un número de raíces por brote de 2.3, 4.4, 4.5, 2.1, 2.6, 2.6, 2.3 y 4.9 respectivamente (Fig. 7). También se enraizaron los brotes obtenidos de yemas axilares de explantes provenientes de árboles adultos, con el tratamiento antes mencionado, cuyo enraizamiento fue de 79.2, 54.2, 83.3, 58.3, 58.3, 62.5, 66.7 y 70.8 %; con una formación de 3.21, 1.92, 3.83, 1.96, 2.17, 2.04, 2.13 y 2 raíces por brote para las especies *Q. castanea*, *Q. chihuahuensis*, *Q. eduardii*, *Q. grisea*, *Q. laeta*, *Q. potosina*, *Q. resinosa*, y *Q. rugosa* respectivamente (Fig. 8). También se enraizaron los brotes obtenidos de yemas axilares de explantes provenientes de árboles adultos, donde la respuesta fue de 75.0, 62.5, 54.2 y 58.3 %; con una formación de 3.0, 2.4, 2.0 y 2.5 raíces por brote en *Q. depressipes*, *Q. eduardii*, *Q. microphylla* y *Q. repanda*, respectivamente (Fig. 9).

El porcentaje de enraizamiento fue menor en los brotes obtenidos de yemas axilares, que en aquellos que provenían del NC. En el enraizamiento se observa claramente que tanto en el porcentaje de respuesta como en el número de raíces por brote y la longitud de las mismas es mayor para todas las especie de encinos rojos que en aquellas especies de encinos blancos.

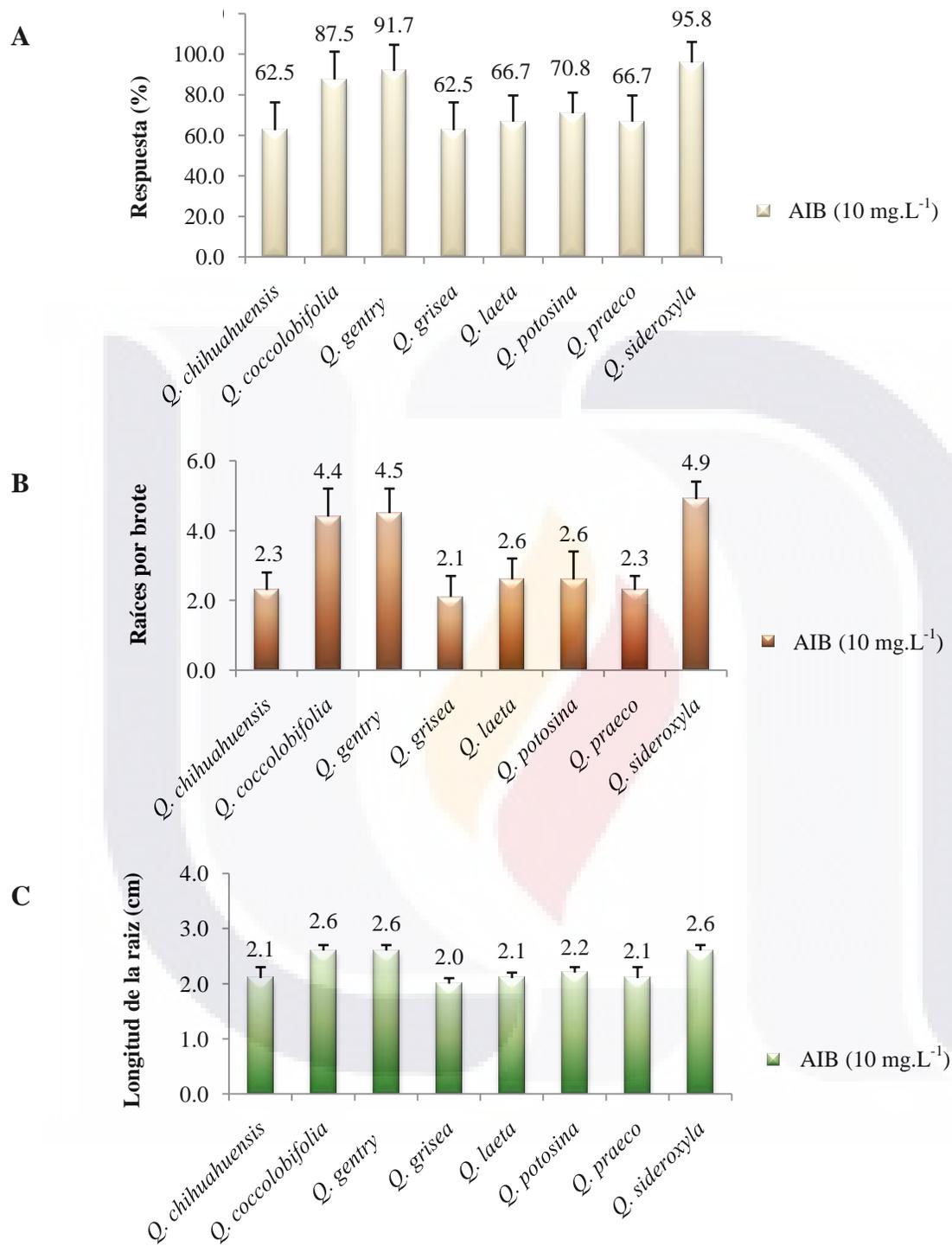


Figura 7. Enraizamiento de brotes obtenidos del NC de las especies *Q. chihuahuensis*, *Q. coccolobifolia*, *Q. gentryi*, *Q. grisea*, *Q. laeta*, *Q. potosina*, *Q. praeco*, y *Q. sideroxyla*, medio MS con 10.0 mg.L⁻¹ de AIB. A) Porcentaje de brotes que formaron raíces. B) Número de raíces por brote. C) Longitud media de las raíces. Los datos representan la media ± DS de seis replicas con cuatro brotes por recipiente (n=24).

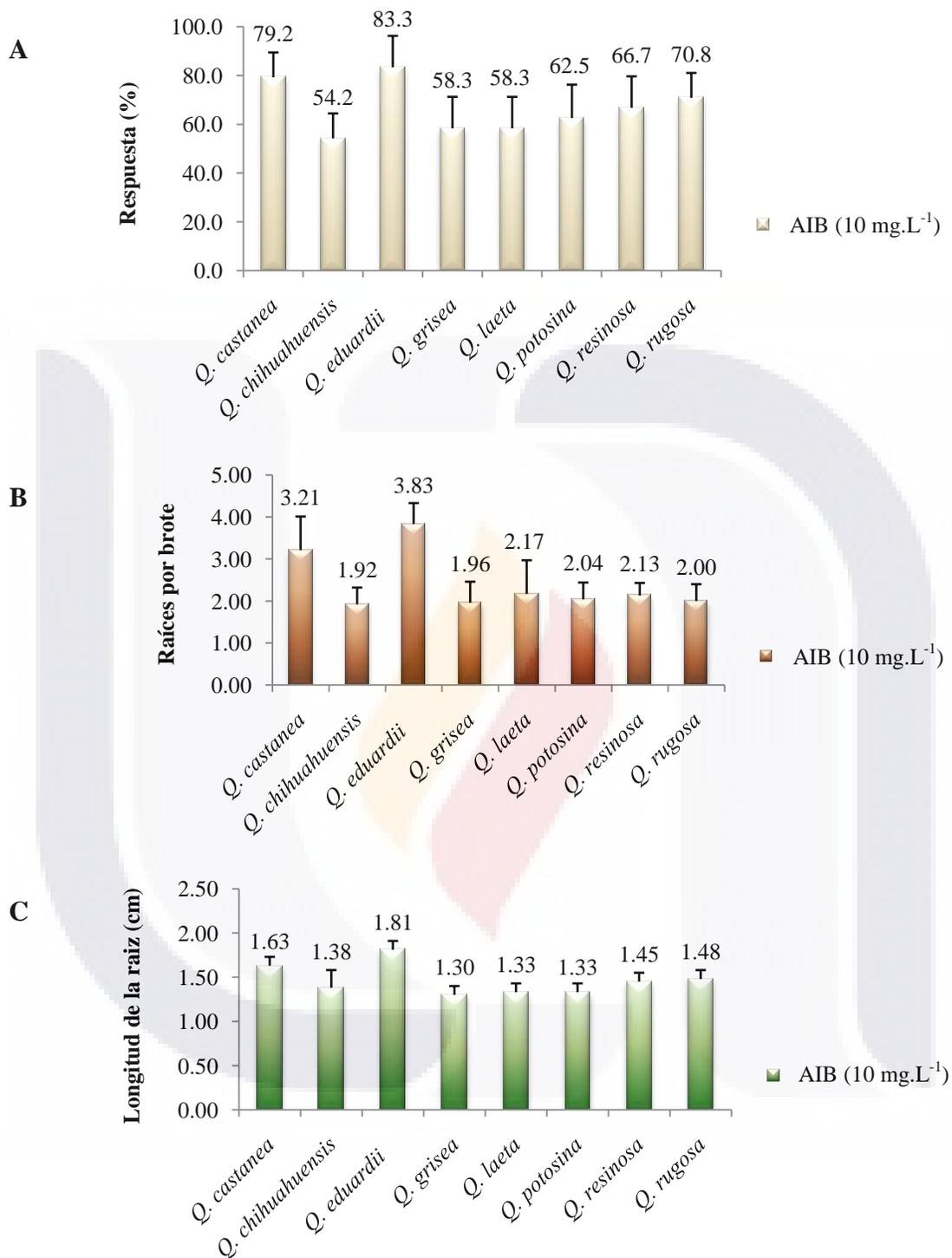


Figura 8. Enraizamiento de brotes obtenidos las yemas axilares de explantes provenientes del NC, en el medio MS con 10.0 mg.L⁻¹ de AIB de las especies: *Q. castanea*, *Q. chihuahuensis*, *Q. eduardii*, *Q. grisea*, *Q. laeta*, *Q. potosina*, *Q. resinosa*, y *Q. rugosa*. A) Porcentaje de brotes que formaron raíces. B) Número de raíces por brote. C) Longitud media de las raíces. Los datos representan la media ± DS de seis replicas con cuatro brotes por recipiente (n=24).

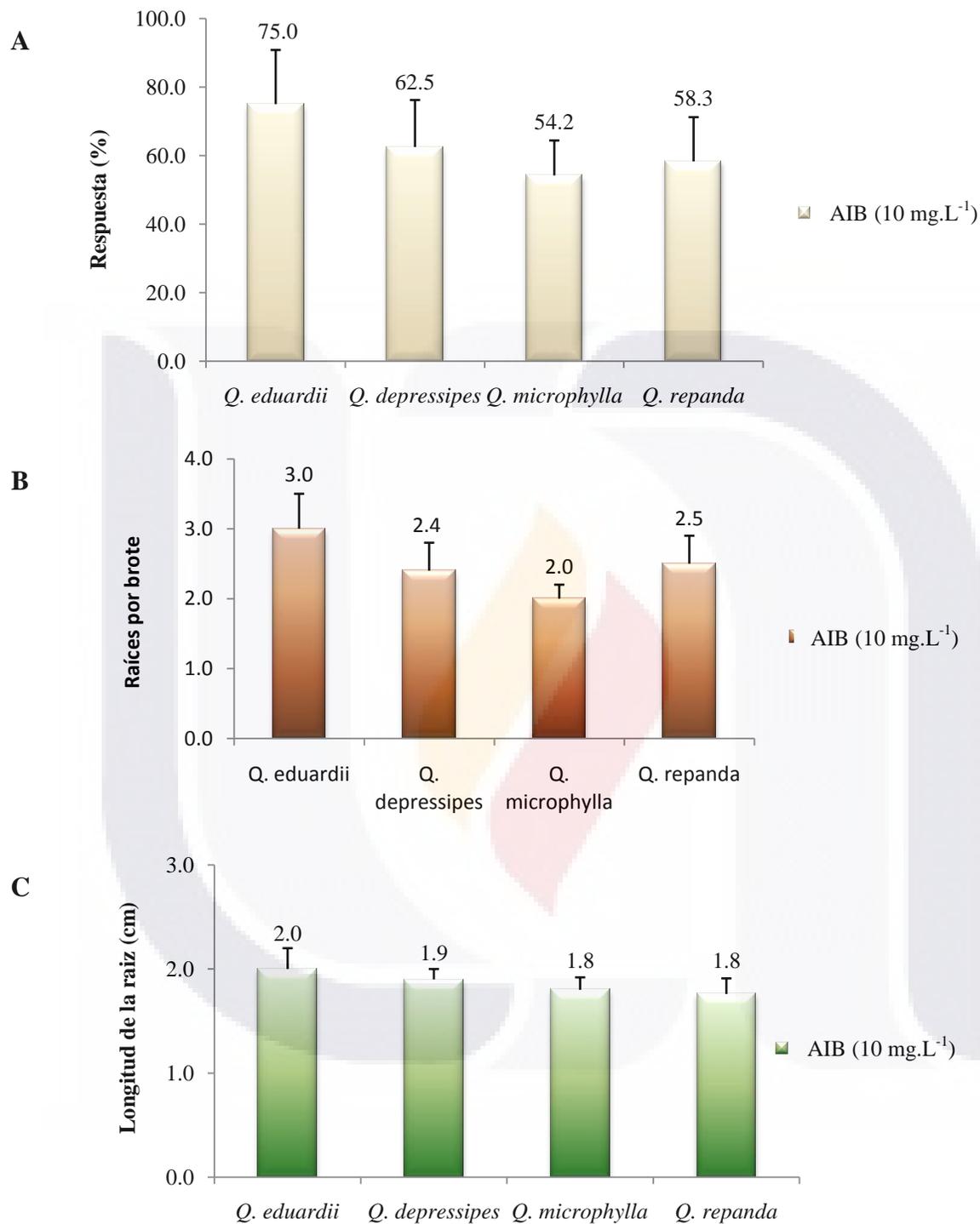


Figura 9. Enraizamiento de brotes obtenidos de yemas axilares de explantes obtenidos de árboles adultos en el medio MS con 10.0 mg.L⁻¹ de AIB de las especies *Q. depressipes*, *Q. eduardii*, *Q. microphylla*, y *Q. repanda*. A) Porcentaje de brotes que formaron raíces. B) Número de raíces por brote. C) Longitud media de las raíces. Los datos representan la media ± DS de seis replicas con cuatro brotes por recipiente (n=24).

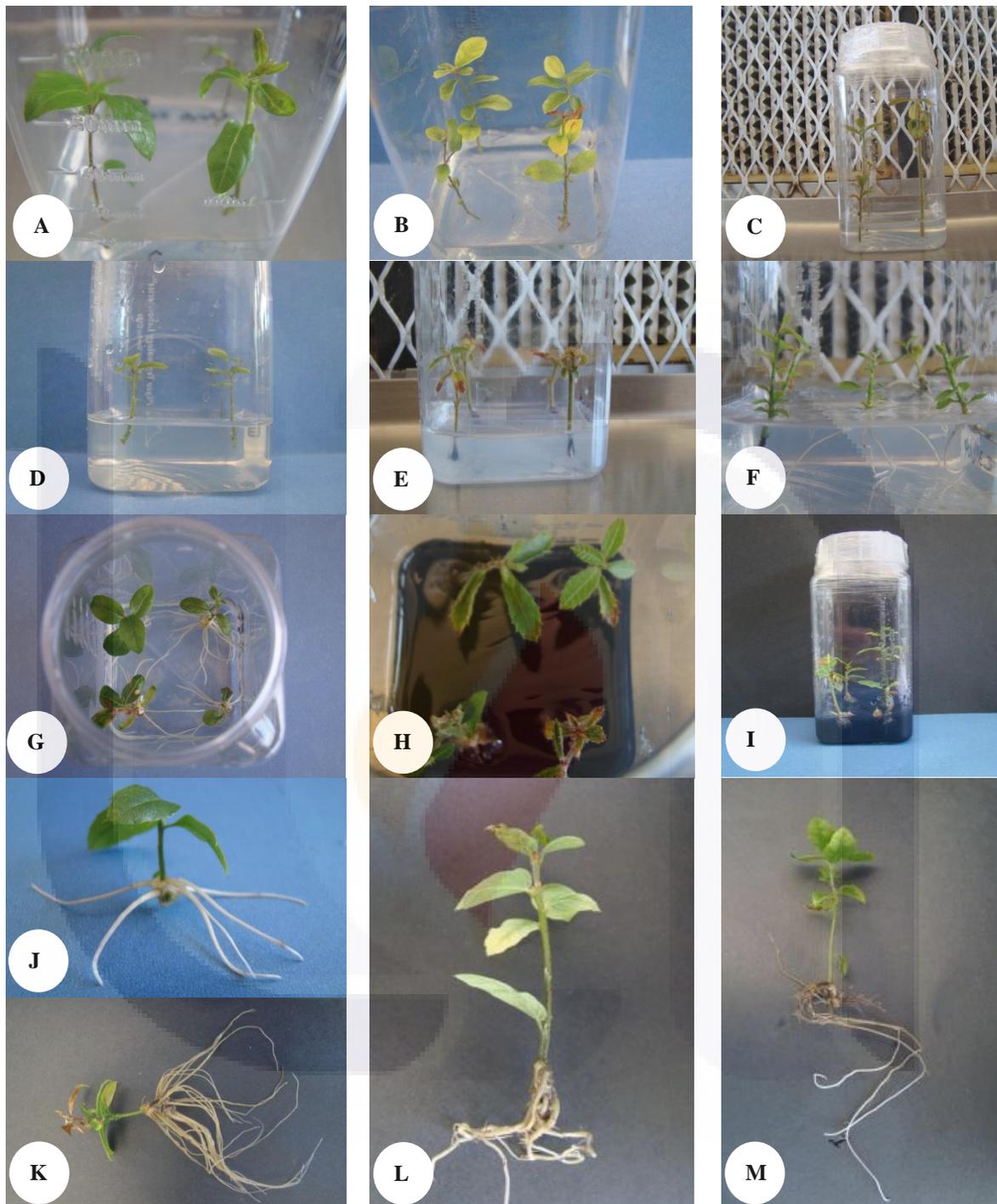


Figura 10. Enraizamiento de brotes con 10 mg.L⁻¹ IBA. Brotes en el medio de inducción A) *Q. castanea*, B) *Q. potosina*, C) *Q. resinosa*, D) *Q. depressipes*. Brotes en el medio de enraizamiento E) *Q. repanda*. F) *Q. sideroxylla* G) *Q. eduardii*. H) *Q. resinosa*. I) *Q. rugosa*. Brotes enraizados Plántulas de con un buen desarrollo de raíces J) *Q. castanea*. K) *Q. sideroxylla*. L) *Q. rugosa*. M) *Q. eduardii*.

4.4 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Inducción de embriogénesis somática en embriones cigóticos

La inducción de la embriogénesis somática en embriones cigóticos inmaduros cultivados en el medio MS complementado con combinaciones de BA con ANA o 2,4-D, o BA y 2iP solos, se alcanzó en las especies examinadas: *Q. castanea*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa* y *Q. rugosa* (Fig. 11 y 12). En el caso de los explantes cultivados en un medio MS con 1.0 mg.L⁻¹ de 2,4-D o ANA combinados con 1.0 mg.L⁻¹ de BA, en la mayoría de los explantes se produce callo compacto no embriogénico y con menor frecuencia, callo friable blanquecino, o ES de manera directa, después de cuatro semanas de cultivo en oscuridad (Fig. 11). Los periodos prolongados (diez semanas) de cultivo en MS con altas concentraciones (3.0 y 4.0 mg.L⁻¹) de BA o 2iP, favorecieron la embriogénesis somática directa en *Q. castanea*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa* y *Q. rugosa*, observándose un mayor número de ES con diferentes etapas de desarrollo, formándose aparentemente sobre el explante y no a partir de callo (Fig. 11D). Kim *et al.* (1994), reportó que la adición de 1.0 mg.L⁻¹ de BA favoreció la inducción de callo embriogénico, usando como explantes embriones inmaduros de *Q. acutissima*. Gingas (1991) reportó que el medio MS con 4.52 µM 2,4-D induce callo amarillento, pero no embriogénico en *Q. rubra*. Por otra parte se reporta para *Q. rubra*, que en los explantes cultivados en MS con 0.45 µM 2,4-D aumentó el porcentaje de ES después de cuatro semanas de cultivo en oscuridad (Vengadesan y Pijut 2009), mientras que Gingas y Lineberger (1989), los obtuvieron con la combinación de 2,4-D y BA.

En el presente estudio la mejor respuesta (inducción de la embriogénesis somática) fue superior al 60% para *Quercus castanea* y *Q. eduardii* (Cuadro 17) en el medio que contenía mayor concentración de auxinas que de citocininas. También se observó la mayor formación de embriones al usar mayor concentración de auxinas que de citocininas para *Q. resinosa* y *Q. rugosa*. Solo se formaron ES en algunos de los explantes con tejido calloso en la que la concentración de auxinas era igual a la de citocininas. Los reguladores de crecimiento son esenciales para inducir la embriogénesis somática, ya que el medio MS por

sí solo no indujo respuesta (Cuadro 17). En otros estudios los RCVs exógenos no fueron necesarios para inducir la embriogénesis somática, como en *Q. rubra* (Gingas y Lineberger 1989) y *Q. robur* (Manzanera *et al.* 1996).

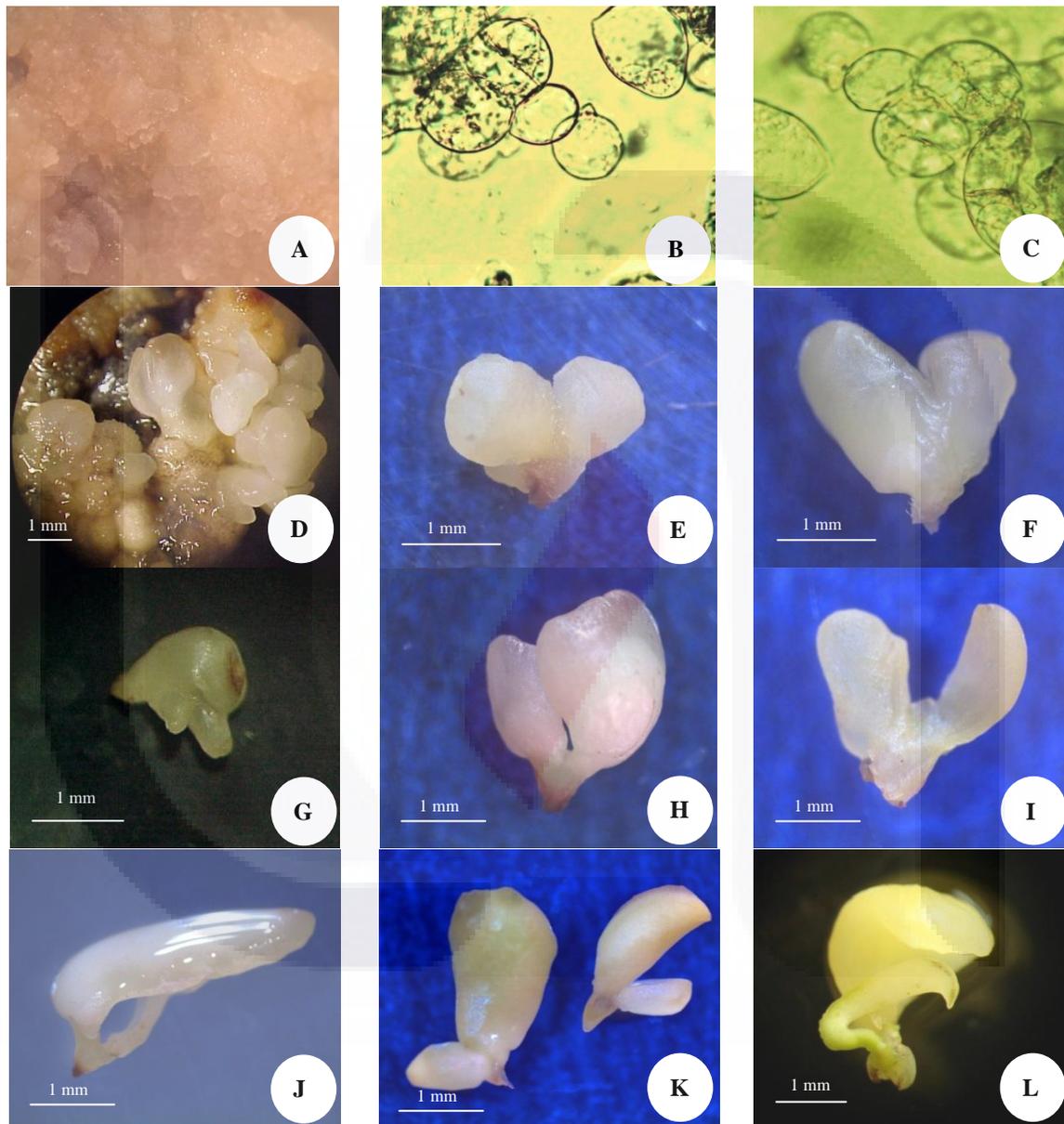


Figura 11. ES en diferentes etapas del desarrollo A) Tejido calloso friable de cotiledones de *Q. eduardii*. B) Células en división de *Q. eduardii*. C) Células en división de *Q. eduardii*. D) ES de *Q. resinosa*. E) Etapa de corazón temprano de *Q. rugosa*. F) Etapa de corazón tardío de *Q. castanea*. G) Etapa de torpedo de *Q. resinosa*. H) Embrión cotiledonar de *Q. rugosa*. I) Etapa cotiledonar de *Q. depressipes*. J) Etapa cotiledonar de *Q. castanea*. K) Etapa cotiledonar de *Q. eduardii*. L) Etapa cotiledonar de *Q. eduardii*.

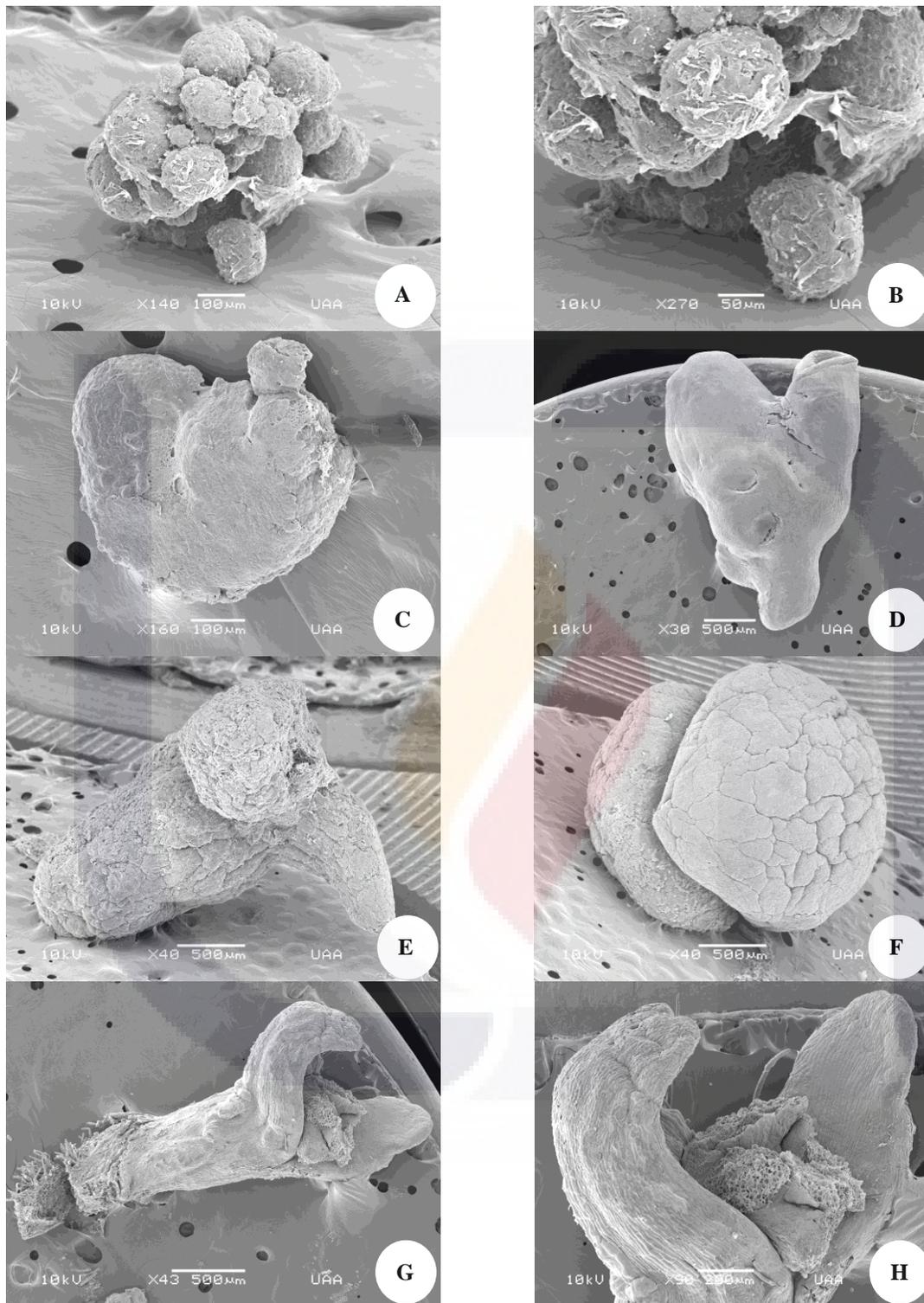


Figura 12. Etapas del desarrollo de ES. A) Fase globular de ES de *Q. eduardii*. B) Fase globular de ES de *Q. eduardii*. C) Estado de corazón temprano de *Q. resinosa*. D) Etapa de corazón tardío de *Q. castanea*. E) Etapa de torpedo de *Q. resinosa*. F) Etapa cotiledonar de *Q. eduardii*. G) Embrión germinado de *Q. rugosa*. H) Embrión germinado de *Q. rugosa*.

Cuadro 17. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre la inducción de la embriogénesis somática en semillas de *Q. castanea*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa* y *Q. rugosa*.

Especie	Tratamiento (mg.L ⁻¹)				Embriogénesis somática (%)	Embriones por explante	Embriones en etapa cotiledonar
	BA	2ip	ANA	2,4-D			
<i>Q. castanea</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0 ± 0.0c	0.0 ± 0.0d	0.0 ± 0.0e
	1.0		1.0		33.3 ± 12.9b	4.7 ± 1.7c	1.1 ± 0.6d
	1.0		2.0		58.3 ± 12.9ab	11.7 ± 2.6b	2.5 ± 1.1bcd
	1.0			1.0	41.7 ± 12.9ab	7.8 ± 2.8bc	1.7 ± 0.8e
	1.0			2.0	62.5 ± 13.7a	18.8 ± 2.4a	4.1 ± 0.5ab
	3.0				37.5 ± 13.7ab	4.0 ± 1.6c	2.7 ± 1.1abcd
	4.0				58.3 ± 20.4ab	7.3 ± 2.3bc	5.4 ± 1.8a
			3.0		50.0 ± 22.4ab	8.1 ± 2.6bc	5.4 ± 2.0ab
			4.0		50.0 ± 22.4ab	5.2 ± 1.5c	2.8 ± 0.5abc
<i>Q. eduardii</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0 ± 0.0c	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0f
	1.0		1.0		33.3 ± 12.9b	5.6 ± 2.0cd	1.4 ± 0.5e
	1.0		2.0		54.2 ± 10.2ab	12.2 ± 2.5b	3.2 ± 1.0cd
	1.0			1.0	41.7 ± 12.9ab	8.8 ± 1.8bc	2.1 ± 0.4de
	1.0			2.0	66.7 ± 12.9a	20.2 ± 2.8a	5.0 ± 0.7ab
	3.0				33.3 ± 12.9b	5.0 ± 1.8d	3.2 ± 0.94cd
	4.0				50.0 ± 15.8ab	7.0 ± 2.7bcd	5.3 ± 2.0abc
			3.0		54.2 ± 10.2ab	9.1 ± 2.4bcd	6.9 ± 1.8a
			4.0		41.7 ± 12.9ab	5.2 ± 1.7d	3.7 ± 1.1bc
<i>Q. resinosa</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0 ± 0.0c	0.0 ± 0.0f	0.0 ± 0.0g
	1.0		1.0		29.2 ± 10.2b	3.3 ± 0.8e	0.8 ± 0.2f
	1.0		2.0		50.0 ± 0.0a	10.1 ± 1.8b	2.4 ± 0.4cd
	1.0			1.0	37.5 ± 13.7ab	6.1 ± 2.2cde	1.5 ± 0.5e
	1.0			2.0	54.2 ± 10.2a	15.1 ± 2.2a	3.8 ± 0.5b
	3.0				33.3 ± 12.9ab	3.4 ± 1.4e	1.6 ± 0.8def
	4.0				45.8 ± 10.2ab	7.4 ± 1.9bcd	4.8 ± 1.8ab
			3.0		54.2 ± 10.2a	8.5 ± 1.3bc	6.6 ± 0.9a
			4.0		45.8 ± 18.8ab	5.5 ± 1.7de	3.8 ± 1.2bc
<i>Q. rugosa</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0 ± 0.0c	0.0 ± 0.0d	0.0 ± 0g
	1.0		1.0		29.2 ± 10.2b	3.9 ± 1.6c	1.0 ± 0.4f
	1.0		2.0		50.0 ± 22.4ab	9.5 ± 3.5ab	2.3 ± 0.9de
	1.0			1.0	37.5 ± 13.7ab	6.3 ± 2.4bc	1.6 ± 0.6ef
	1.0			2.0	58.3 ± 12.9a	15.5 ± 3.3a	3.5 ± 0.5bcd
	3.0				41.7 ± 12.9ab	4.8 ± 1.2c	2.9 ± 1.1cde
	4.0				50.0 ± 0.0a	7.3 ± 1.2b	5.0 ± 0.9a
			3.0		58.3 ± 20.4ab	8.7 ± 2.6b	6.0 ± 1.9a
			4.0		50.0 ± 15.8ab	6.1 ± 1.2bc	4.3 ± 1.0abc

Los datos representan la media ± DS de seis replicas con cuatro explantes por recipiente (n=24). Los columnas con diferente literal difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey (P<0.05)

Inducción de embriogénesis somática en tejidos maduros (hojas y entrenudos)

En ensayos previos 3 días después del cultivo, varios entrenudos y la mayoría de los explantes de hoja se contaminaron superficialmente con hongos, por lo que se optimizó el protocolo de limpieza y desinfección, ajustando los tiempos y añadiendo peróxido de hidrógeno. Estas modificaciones redujeron sustancialmente la contaminación (datos no mostrados). La embriogénesis somática fue inducida en explantes de hoja y entrenudos, tomados de árboles adultos (Fig. 13). El porcentaje de respuesta varió para cada una de las especies probadas. En el medio de inducción, la respuesta de los entrenudos fue significativamente más alta que en los explantes de hoja, presentando una respuesta en entrenudos de: 66.7, 83.3, 62.5 y 70.8 %; y en hoja de: 33.3, 29.2, 20.8 y 37.5 % para *Q. depressipes*, *Q. eduarddi*, *Q. resinosa* y *Q. rugosa* respectivamente (Fig. 14). La formación de callo comenzó siempre en las zonas de corte de los entrenudos y después se extendió sobre estos, cubriéndolos eventualmente, lo que sugiere un gradiente de reguladores de crecimiento en el interior de los explantes. La adición al medio de 2,4-D en mayor proporción que la BA, indujo la formación de callo friable, en tanto que al usar BA en la misma proporción que el 2,4-D se produjo callo compacto. En el caso de las hojas los porcentajes de inducción de la embriogénesis somática fueron muy bajos (20.8 a 37.5 %), debido a la necrosis del tejido. En las hojas que hubo respuesta, el tejido calloso inicialmente se formó en el área de corte y los ES se originaban del nervio central de la hoja. El medio MS sin RCV no indujo la embriogénesis somática en este tipo de explantes.

Una vez obtenidos los ES, se separaron los que se distinguían de la masa embriogénica, ya que el desarrollo de los ES fue asíncrono, esto es, en un mismo grupo de embriones se observaban en un mismo grupo de embriones varias etapas del desarrollo. Los ES obtenidos, eran estructuras polares blanquecinas con cotiledones. Se presentaron pocos ES anormales.

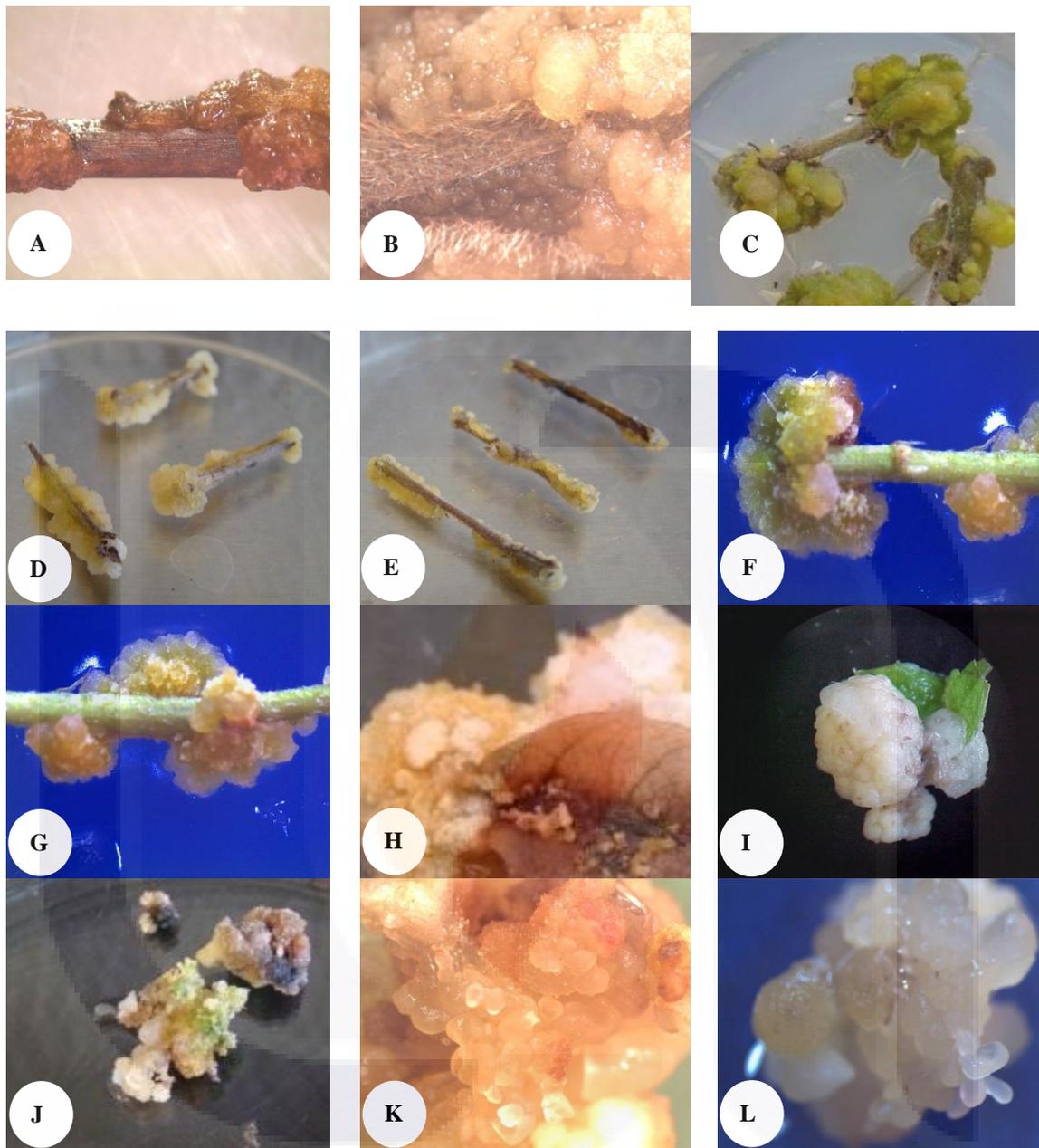


Figura 13. Inducción de embriogénesis somática en entrenudos y hojas. A) Callo compacto en un entrenudo de *Q. rugosa*. B) Tejido calloso friable en un entrenudo de *Q. resinosa*. C) Callo compacto en un entrenudo de *Q. resinosa*. D) Callo embriogénico en un entrenudo de *Q. depressipes*. E) Callo embriogénico en un entrenudo de *Q. eduardii*. F) Callo embriogénico en un entrenudo de *Q. resinosa*. G) Callo embriogénico en un entrenudo de *Q. resinosa*. H). Callo embriogénico en hoja de *Q. castanea* I) Tejido calloso friable en hoja de *Q. eduardii*. J) Callo embriogénico de hoja de *Q. rugosa*. K) Callo embriogénico de un entrenudo de *Q. eduardii*. L) Callo embriogénico de hoja de *Q. resinosa*.

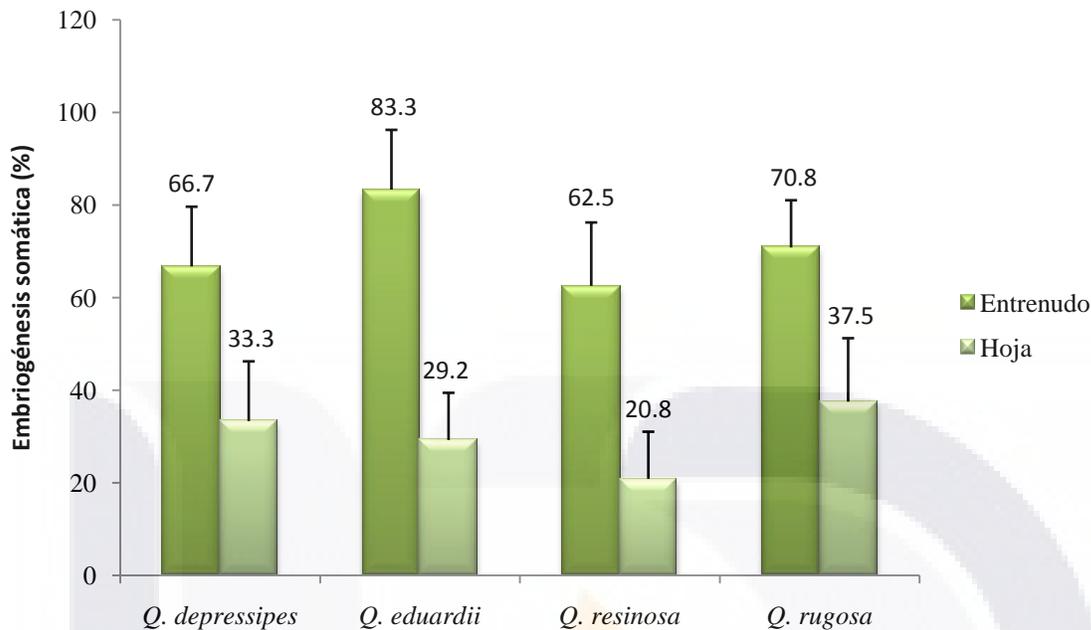


Figura 14. Porcentaje de explantes que formaron ES de *Q. depressipes*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa* y *Q. rugosa*. Los datos representan la media \pm DS.

Embriogénesis secundaria

La producción de ES secundarios de embriones primarios ocurrió frecuentemente (Fig. 15), cuando los embriones fueron mantenidos en el medio de inducción o al cambiar el tejido calloso embriogénico o masas de embriones no diferenciados a medio fresco (medio de inducción). La embriogénesis recurrente se detuvo hasta que se aislaban los embriones y se cultivaban en el medio de maduración. La formación de embriones secundarios a partir de embriones primarios también se ha descrito en otros árboles leñosos tales como *Robinia pseudoacacia* (Arrillaga *et al.* 1994) y *Quercus robur* (Cuenca *et al.* 1999). La embriogénesis secundaria tiene un gran potencial para la propagación masiva y la embriogénesis repetitiva, que también puede usarse para la transformación genética de los árboles forestales (Merkle 1995). Un factor importante para la maduración de ES es el control de la embriogénesis recurrente.

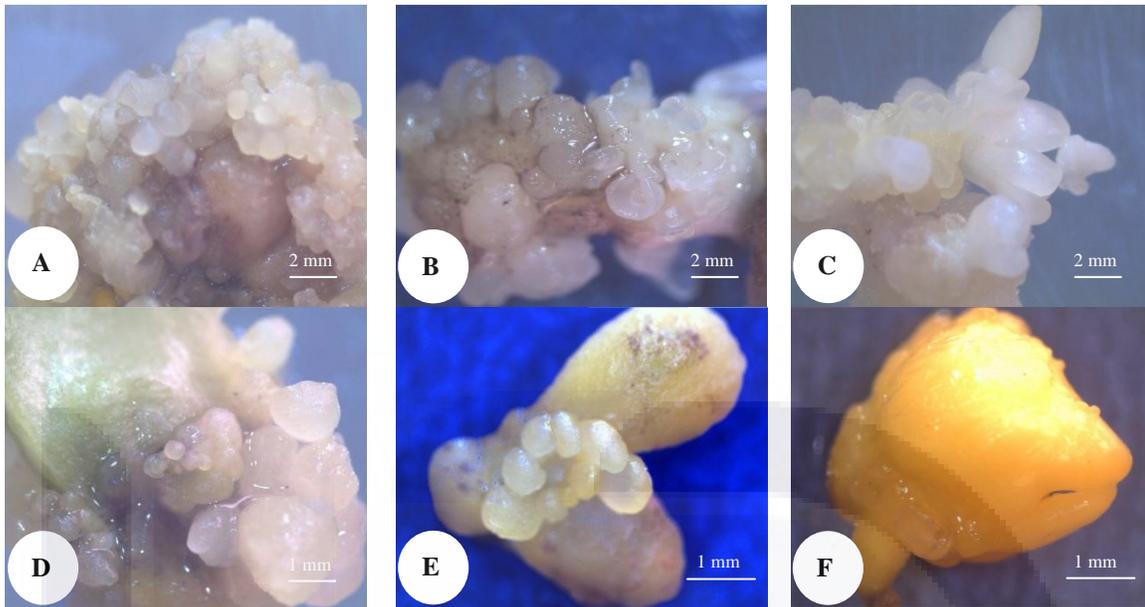


Figura 15. Eventos en la embriogénesis somática. A) Células embriogénicas, proembriones y callo friable en semillas de *Q. eduardii*. B) ES en maduración de *Q. rugosa*. C) ES en maduración de *Q. castanea*. D) Proembriones y callo friable en un cotiledón de *Q. resinosa*. E) Embriogénesis somática secundaria en un ES de *Q. resinosa*. F) Embriogénesis somática secundaria en un ES de *Q. rugosa*.

Maduración de los embriones somáticos

Una vez inducidos los ES se transfirieron a medio MS con sacarosa al 5% (*p/v*) y Phytigel al 0.25% (*p/v*), carentes de reguladores, con el objetivo de favorecer su maduración. Los embriones cultivados en el medio de maduración, incrementaron sustancialmente su tamaño y favoreció su diferenciación. Durante la maduración, los embriones experimentaron cambios morfológicos, gracias a la limitación del agua debida al incremento en la concentración de sacarosa. Los cambios morfológicos y bioquímicos, implican la deposición de proteínas de almacenamiento, la represión de la germinación y la adquisición de tolerancia a la desecación (Braybrook y Harada 2008). Se ha descrito que la maduración de ES de *Q. robur* en medios con concentraciones crecientes de agar, redujo la disponibilidad de agua y el potencial de solutos de los ES, lo que mejoró la tasa de germinación (Prewein *et al.* 2004). De igual forma, Sánchez *et al.* (2003) indicaron que la tasa de conversión de ES de *Q. robur* de origen juvenil se favoreció cultivando masas embriogénicas en medios de maduración con altos contenidos en carbohidratos. En numerosas revisiones, se ha descrito la embriogénesis somática en especies leñosas. Sin

embargo, en muchas de ellas tanto la maduración como la conversión a una planta viable, son poco eficientes, por lo que son necesarios tratamientos adicionales para optimizar la maduración. Thomas (1993) indicó que los ES tienden a desarrollarse de forma similar a los embriones cigóticos, consiguiendo las adaptaciones fisiológicas necesarias para el inicio de un nuevo programa post-germinativo.

Durante las transferencias sucesivas (cada seis semanas) a medio fresco de las líneas embriónicas, mantenidas en condiciones de proliferación, se seleccionaron ES (en etapa cotiledonar) que habían madurado espontáneamente para proceder a germinarlos. El hecho de que algunos ES maduren espontáneamente sin producir embriogénesis secundaria, seguramente está relacionado con una baja disponibilidad de nutrientes y el aislamiento de dichos embriones, ocasionado por el aumento de la densidad del cultivo dentro del recipiente. En algunos trabajos se ha referido esta circunstancia como un posible desencadenante de la maduración (von Aderkas y Bonga 2000). La mayor parte de los embriones que no germinan o no alcanzan a madurar es porque forman embriones secundarios (Fernández-Guijarro *et al.* 2004).

Germinación de los embriones somáticos

En el presente estudio la germinación ocurrió con la emergencia de la raíz y posteriormente de un brote con hojas (Fig. 16). Los ES en estado cotiledonar tardío cultivados en el medio de germinación después de la desecación por aeración, en la campana de flujo laminar, germinaron, obteniendo porcentajes de germinación de: 58, 64, 48 y 56 % para *Q. castanea*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa* y *Q. rugosa* respectivamente (Fig. 17). Se observó que la desecación y esencialmente la adición de carbón activado al medio de cultivo, incrementa significativamente la germinación de los ES, en comparación al medio sin carbón activado o con BA. Los ES en presencia de carbón activado mostraron un mayor desarrollo, hojas más grandes y más verdes y mayor desarrollo radicular, lo cual es una característica positiva para la supervivencia de las plántulas (García-Martín *et al.*, 2001). Además no se observaron anomalías en las hojas de las plantas generadas,

efecto que podría deberse a que no se utilizaron reguladores de crecimiento durante la multiplicación, maduración y germinación de los ES. No obstante, las plantas generadas de los ES muestran hojas pequeñas y entrenudos cortos durante su crecimiento *in vitro*.

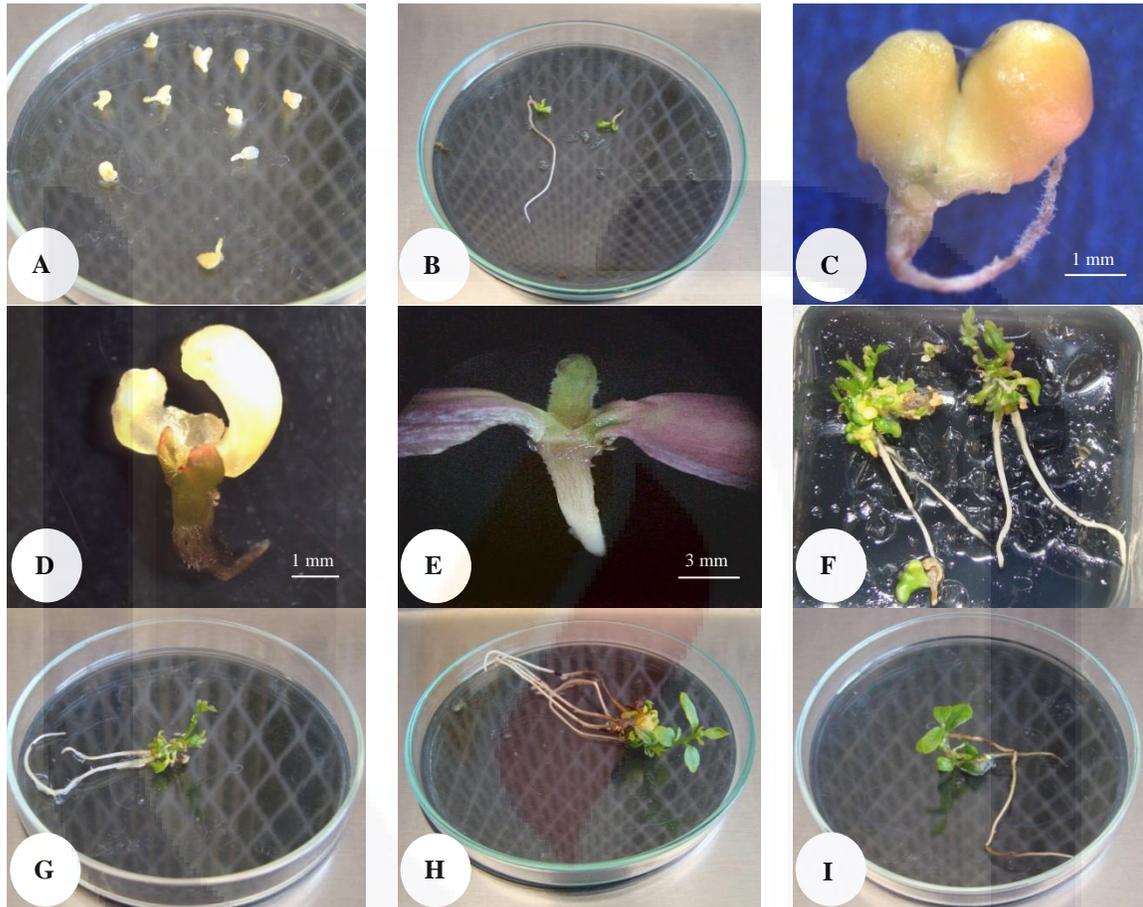


Figura 16. Embriones germinados A) *Q. resinosa*. B) *Q. resinosa*. C) *Q. eduardii*. D) *Q. rugosa*. E) Comparación de un embrión cigótico germinado de *Q. rugosa*. F) Brotes formados sobre un ES de *Q. castanea*, G) *Q. castanea*. H) Plántula de *Q. rugosa*. I) Plántula de *Q. eduardii*.

Los ES se desarrollaron bajo luz continua después de un periodo de cuatro semanas de oscuridad. Algo interesante a destacar es que los ES cultivados en el medio de germinación con BA después de 3 semanas forman varios brotes a partir del NC como ocurre con los embriones cigóticos (Fig. 16F y G). Sin embargo, el porcentaje de germinación fue menor en comparación con los ES cultivados en carbón activado. En otras especies como en *Q. robur* se logró la germinación de ES usando 0.1 mg.L^{-1} de BA (Valladares *et al.* 2006). La adición de ABA o el incremento de la sacarosa en el medio

también mejoró la conversión en *Q. robur* (Cuenca *et al.* 1999) y *Q. suber* (García-Martín *et al.* 2001). La germinación de ES en *Q. rubra* se alcanzó por la desecación con sorbitol o aeración (Gingas y Lineberger 1989).

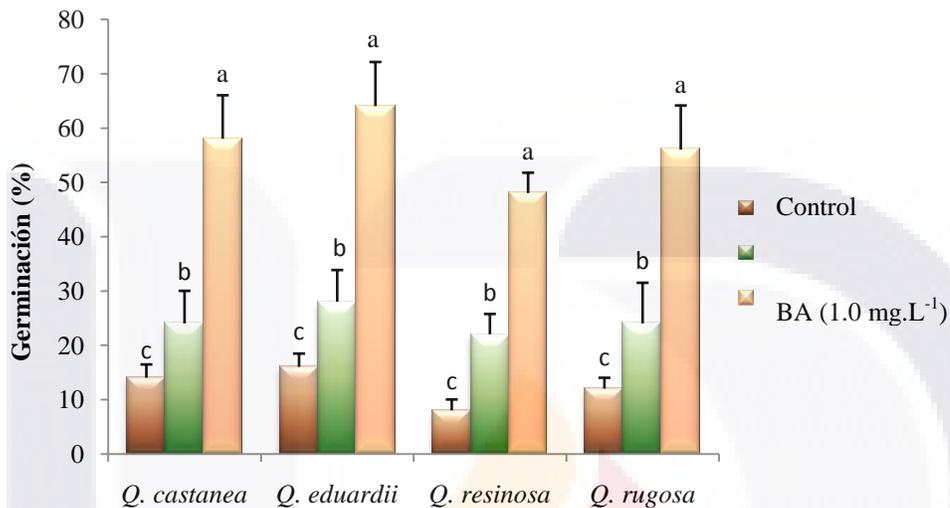


Figura 17. Porcentaje de embriones somáticos que germinaron de *Q. castanea*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa* y *Q. rugosa*. Los datos representan la media \pm DS. Se utilizaron 50 embriones somáticos en estado cotiledonar tardío.

Conservación en frío de líneas embriogénicas

En el presente estudio, se observó la recuperación del crecimiento activo de las líneas embriogénicas de *Q. castanea*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa* y *Q. rugosa*, almacenadas a 4 ± 1 °C y en el medios de inducción. Los cultivos se mantuvieron hasta cuatro meses en frío, sin pérdida de actividad embriogénica, ya que después de tres semanas de haberlos regresado a las condiciones de crecimiento activo, los cultivos se recuperaron paulatinamente, con pérdida de ciertas partes de la masa embriogénica. Cabe subrayar que el almacenamiento en frío, no permitió mantener las líneas embriogénicas durante ciclos repetitivos, ya que se observó que perdían su capacidad embriogénica, es decir las masas embriogénicas aun estando en el medio de inducción fresco, ya no se multiplicaron y el tejido presentó oxidación o necrosis. Sin embargo se observó, que después del tratamiento en frío, los ES cultivados en el medio de maduración y posteriormente en el de germinación, estos germinaron.

4.5 ADAPTACIÓN A CONDICIONES DE INVERNADERO DE LAS PLANTAS GENERADAS DEL ENRAIZAMIENTO DE BROTES OBTENIDOS DEL NC Y YEMAS AXILARES, ASÍ COMO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

En el período de aclimatación se aspira a que las plántulas que han crecido *in vitro*, que han estado expuestas a un microambiente controlado, se adapten a las condiciones *ex vitro*. En este sentido las plantas regeneradas en los diferentes tratamientos, tenían una apariencia normal, muy semejantes a las plantas que crecen en campo. Sin embargo, las plántulas obtenidas de ES mostraron hojas pequeñas y entrenudos cortos durante su crecimiento *in vitro*, cuestión que se corrigió en algunos casos, a lo largo del crecimiento *ex vitro*.

Las plántulas obtenidas de los diferentes tratamientos de regeneración se trasplantaron a macetas para su aclimatación (Fig. 18 y 19). Las plántulas crecieron y en la mayoría se observó la formación de nuevas hojas. Las plantas que sobrevivieron en la cámara bioclimática se transfirieron al invernadero. Los ES germinados y las plantas obtenidas tanto del NC como de yemas axilares se aclimataron exitosamente obteniendo en algunos casos porcentajes de sobrevivencia por encima del 80 %, después de tres meses en el invernadero, como lo fue para las plantas de *Q. eduardii*, obtenidas de brotes enraizados provenientes del NC (Cuadro 18).

En el caso de las plantas obtenidas de NC y de las yemas axilares, con varias hojas y mayores a 4 cm, su aclimatación en la mayoría de los casos fue exitosa. Por el contrario cuando presentaban pocas hojas y pequeñas, el porcentaje de supervivencia fue del 33.3 % para *Q. eduardii* y *Q. castanea* (plantas provenientes de ES inducidos en semillas). En el caso de las plantas obtenidas de ES inducidos en hojas e internodos, la mayor supervivencia fue del 25% para *Q. eduardii*. El principal factor que posiblemente influyó en la baja eficacia en la aclimatación de ES a plantas, es la falta de reservas suficientes en los cotiledones, que facilitarían un mejor desarrollo después de la germinación. Tal como ocurre con otras especies del género *Quercus* (Wilhelm 2000).

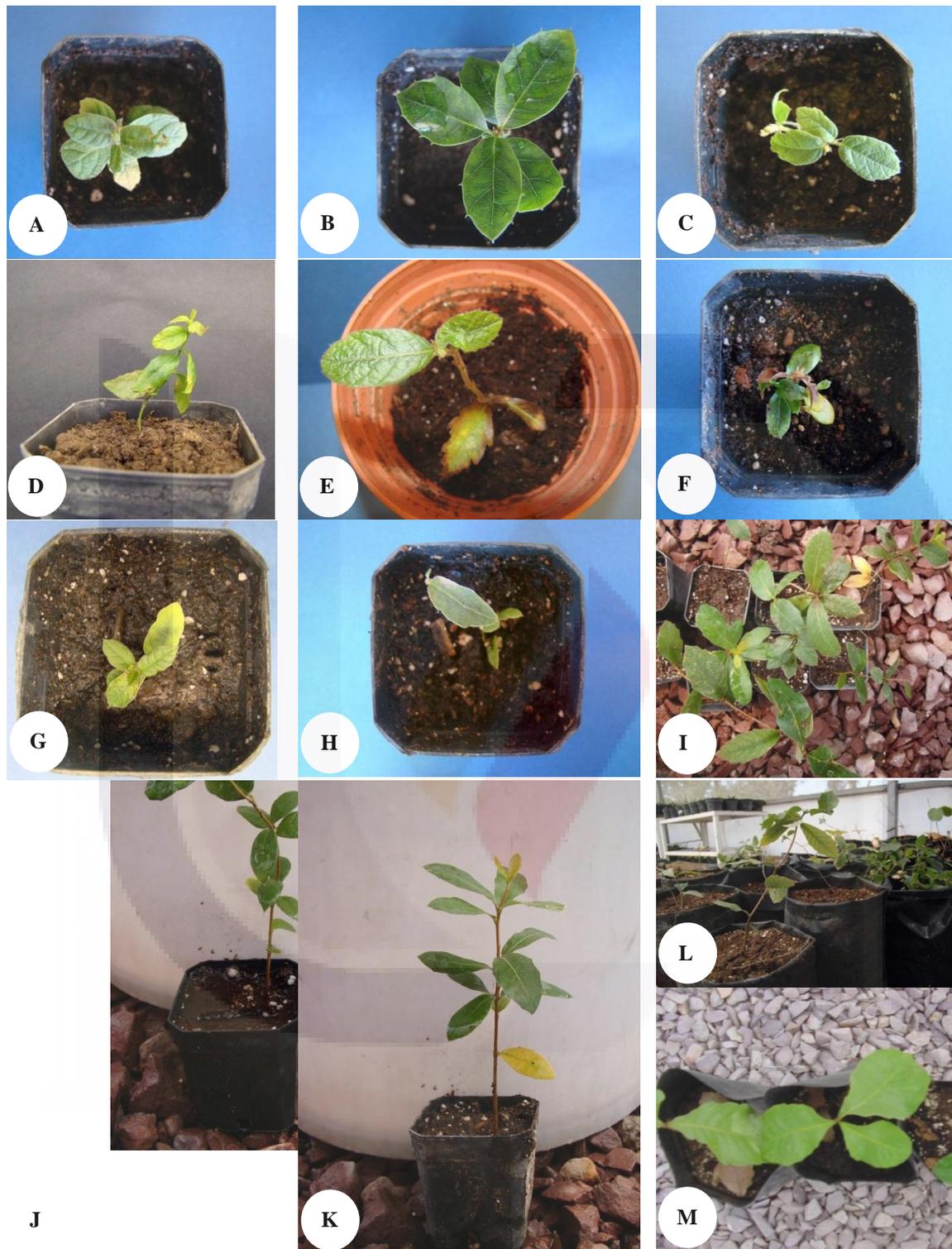


Figura 18. Plántulas trasplantadas a sustrato para su aclimatación. Provenientes del NC. A) *Q. rugosa*. B) *Q. eduardii*. C) *Q. castanea*. D) *Q. potosina* E) *Q. resinosa*. Plántulas obtenidas brotes enraizados provenientes de yemas axilares F) *Q. sideroxylla*. G) *Q. chihuahuensis*. H) *Q. depressipes*. Plantas transferidas a invernadero I) *Q. spp*. J) *Q. castanea*. K) *Q. eduardii*. L) Plantas de *Q. spp* adaptándose al invernadero M) Plantas de *Q. resinosa* después de 6 meses en el invernadero.

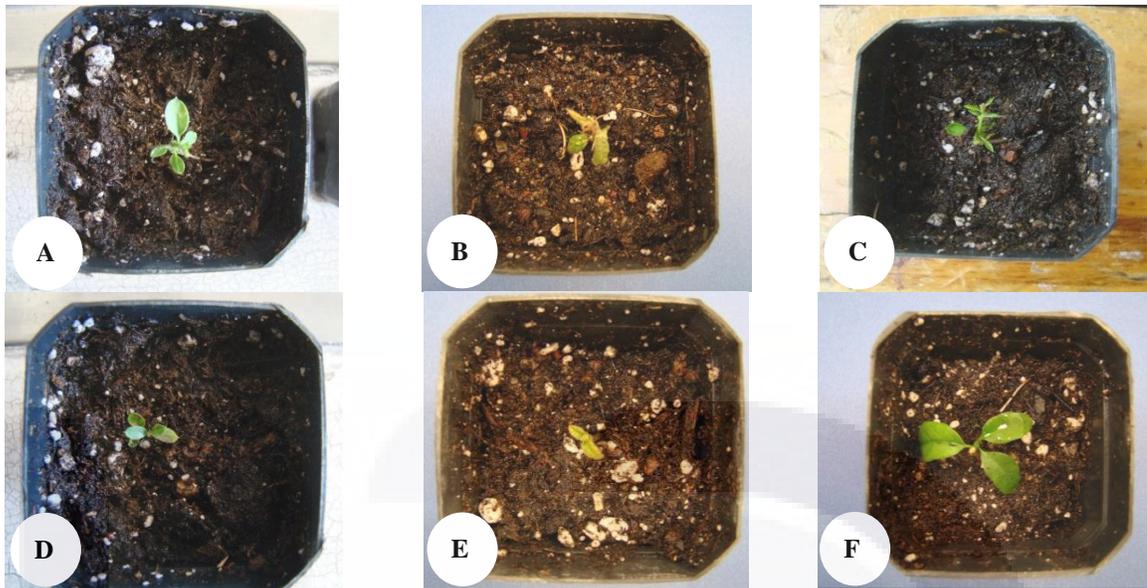


Figura 19. Plántulas obtenidas de ES, trasplantadas a sustrato para su aclimatación. A) *Q. eduardii*. B) *Q. rugosa*. C) *Q. castanea*. D) *Q. depressipes*. E) *Q. resinosa*. F) *Q. eduardii*.

Se realizó el trasplante a suelo de las plantas de encinos sobresalientes, provenientes del NC, previamente adaptadas a condiciones de invernadero durante 8 meses. Las plantas de *Q. eduardii*, se establecieron en un terreno adecuado para su crecimiento (Jardín Botánico de la Universidad Autónoma de Aguascalientes). Se midió la supervivencia a los tres años (2012) del establecimiento y se observó un 100 % de supervivencia de las 6 plantas trasplantadas de *Q. eduardii* (Fig. 20). Dado que el establecimiento de las plantas es relativamente reciente y solo se probó una especie, será necesario trasplantar más plantas y más especies en el mismo terreno y en algún otro, además de seguir recopilando datos a lo largo de sucesivos periodos vegetativos, con el fin de confirmar las distintas tendencias del crecimiento de los diferentes orígenes de las plantas.



Figura 20. Plantas de *Q. eduardii* después de tres años de trasplantadas a suelo.

Cuadro 18. Porcentajes de aclimatación para cada especie

Procedencia Especie	Nudo cotiledonar		Yemas axilares		Embriogénesis somática	
	I %		I %	E %	J %	A %
<i>Q. castanea</i>	80.0		61.9		33.3	
<i>Q. chihuahuensis</i>	23.3		9.5			
<i>Q. coccolobifolia</i>	76.7					
<i>Q. depressipes</i>				38.1		16.7
<i>Q. eudardii</i>	83.3		66.7	71.4	33.3	25.0
<i>Q. gentryi</i>	70.0					
<i>Q. grisea</i>	13.3		4.8			
<i>Q. laeta</i>	73.3		19.0			
<i>Q. microphylla</i>				14.3		
<i>Q. potosina</i>	76.7		38.1			
<i>Q. praeco</i>	20.0					
<i>Q. repanda</i>				19.1		
<i>Q. resinosa</i>	73.3		52.4		16.7	8.3
<i>Q. rugosa</i>	70.0		57.1		25.0	8.3
<i>Q. sideroxylla</i>	80.0					

Número de plantas sometidas a aclimatación: NC = 30, yemas axilares = 21 y ES = 12. I. Explantes obtenidos de una fuente *in vitro* (semillas). E. Explantes obtenidos de una fuente *ex vitro*. J. Explantes juveniles (semillas). A. Explantes de árboles adultos (hojas y entrenudos).

Recapitulando, en el Cuadro 19 se observan los distintos experimentos a los que se sometió cada especie, según la disponibilidad del material vegetal.

Cuadro 19. Vías de regeneración que se utilizó para cada especie.

Propagación Especie	Nudo cotiledonar	Yemas axilares		Enraizamiento	Embriogénesis somática				Adaptación		
		I	E		IN		MD		GR	CB	INV
					J	A	J	A			
<i>Q. castanea</i>	x	x		x	x	x	x		x	x	
<i>Q. chihuahuensis</i>	x	x		x					x	x	
<i>Q. coccolobifolia</i>	x			x					x	x	
<i>Q. depressipes</i>			x	x		x	x	x	x	x	
<i>Q. eudardii</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
<i>Q. gentryi</i>	x			x					x	x	
<i>Q. grisea</i>	x	x		x					x	x	
<i>Q. laeta</i>	x	x		x					x	x	
<i>Q. microphylla</i>			x	x					x	x	
<i>Q. potosina</i>	x	x		x					x	x	
<i>Q. praeco</i>	x			x					x	x	
<i>Q. repanda</i>			x	x					x	x	
<i>Q. resinosa</i>	x	x		x	x	x	x	x	x	x	
<i>Q. rugosa</i>	x	x		x	x	x	x	x	x	x	
<i>Q. sideroxylla</i>	x			x					x	x	

I. Explantes obtenidos de una fuente *in vitro* (semillas). E. Explantes obtenidos de una fuente *ex vitro* (entrenudos de ramas). J. Explantes juveniles (semillas). A. Explantes de árboles adultos (hojas y entrenudos). IN. Inducción CB. Cámara bioclimática. GR. Germinación. INV. Invernadero.



5. CONCLUSIONES

- ❖ Se establecieron cultivos *in vitro* de las especies: *Quercus castanea*, *Q. chihuahuensis*, *Q. coccolobifolia*, *Q. depressipes*, *Q. eudardii*, *Q. gentryi*, *Q. grisea*, *Q. laeta*, *Q. microphylla*, *Q. potosina*, *Q. praeco*, *Q. repanda*, *Q. resinosa*, *Q. rugosa* y *Q. sideroxylla*.
- ❖ La adición de citocininas al medio de cultivo (BA o CIN) favoreció la brotación múltiple del NC axilares, tanto de segmentos nodales tomados de brotes obtenidos del NC, como obtenidos de ramas de árboles adultos y del nudo cotiledonar.
- ❖ La adición de citocininas al medio de cultivo (BA, CIN o 2iP) favoreció la respuesta de yemas axilares, tanto de segmentos nodales tomados de brotes obtenidos del NC, como obtenidos de ramas de árboles adultos.
- ❖ Se obtuvieron más de 10 plantas a partir de una sola semilla, una vez enraizados los brotes obtenidos de yemas axilares, cuyos explante procedieron de brotes del NC.
- ❖ El AIB favoreció el enraizamiento de los brotes generados tanto del NC, como de los brotes generados a partir de yemas axilares y cuyo aumento en su concentración estimula la frecuencia de enraizamiento, incrementa el número de raíces formadas, aumenta la longitud de las raíces y reduce el tiempo de aparición de las raíces y sin la formación de callo. La adición del carbón activado en el medio de enraizamiento incrementó el número de raíces por brote, su longitud, el número de raíces secundarias, así como el vigor en las hojas.
- ❖ El uso de auxinas como ANA y 2,4-D combinadas con BA, favoreció la inducción de la embriogénesis somática en embriones cigóticos maduros y principalmente de inmaduros, así como en explantes internodales y de hoja.

- ❖ La madurez del embrión cigótico, la calidad y madurez de los explantes de entrenudos y de hoja, así como el genotipo condicionan drásticamente la respuesta embriogénica.
- ❖ La adición de 50 m.L⁻¹ de sacarosa al medio de cultivo, así como un periodo corto de desecación por aeración, favoreció significativamente la maduración de ES obtenidos. La presencia de carbón activado en el medio de germinación favorece significativamente el desarrollo y germinación de ES. El incremento de la concentración de sacarosa en el medio de maduración, no controla totalmente la embriogénesis secundaria de los ES, lo que si la interrumpe es el aislamiento de ES del medio de inducción.
- ❖ Las líneas embriogénicas almacenadas a 4°C (hasta tres meses) conservaron su capacidad de proliferación permitiendo con ello la posibilidad de reducir los gastos de su mantenimiento.
- ❖ Se establecieron las condiciones para la transferencia a suelo de las plantas generadas a través del enraizamiento de brotes obtenidos del NC y de yemas axilares, así como de las plantas generadas a través de la embriogénesis somática.
- ❖ Aunque las plantas procedentes de bellotas germinadas en el campo o las obtenidas *in vitro* por medio del NC o yemas axilares crecen inicialmente mejor que las procedentes de ES, debido a la ventaja que representa las mayores reservas en sus cotiledones, en las plantas originadas de ES una vez adaptadas, estas diferencias desaparecen con el tiempo.
- ❖ De acuerdo a las especies estudiadas en el presente trabajo, los encinos rojos muestran una mejor respuesta en la propagación *in vitro* que los encinos blancos, ya sea vía embriogénesis somática o por medio de la brotación de yemas axilares o del NC y sobre todo en el enraizamiento de los brotes generados por esta vía.

-
- ❖ El presente estudio es el primer informe de la propagación *in vitro* de encinos mexicanos. Los resultados muestran el éxito en la propagación *in vitro* a través de la embriogénesis somática o por medio de la brotación de yemas y sobre todo en el enraizamiento de los brotes generados por esta vía. Los procedimientos descritos en este estudio pueden facilitar el mejoramiento, la conservación y la propagación en masa de las especies de encinos tratadas.
 - ❖ De acuerdo al protocolo desarrollado se determinó que las especies de encino seleccionadas, nativas del estado de Aguascalientes, pueden ser propagadas *in vitro* a partir de todos los explantes utilizados, semillas, hojas, segmentos nodales e internodales.





6. BIBLIOGRAFÍA

- Arrillaga I, Tobolski J, Merkle SA (1994) Advances in somatic embryogenesis and plant production of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Plant Cell Rep* **13**:171–175.
- Bueno MA, Gomez A, Boscaiu M, Manzanera JA, Vicente O (1997) Stress induced haploid plant production from anther cultures of *Quercus suber*. *Physiol Plant* **99**:335-341.
- Braybrook SA, Harada JJ (2008) LECs go crazy in embryo development. *Trends Plant Sci* **13**:624–630.
- Chalupa AV (1987) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Picea*, *Quercus*, *Betula*, *Tilia*, *Robinia*, *Fagus* and *Aesculus*. *Communications Instituti Forestalis Cechosloveniae* **15**:133-148.
- Chalupa V (1988) Large scale micropropagation of *Quercus robur* L. using adenine-type cytokinins and thidiazuron to stimulate shoot proliferation. *Biol Plant* **30**:414-421.
- Chalupa AV (1990). Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tillia cordata* Mill.). *Plant Cell Rep* **9**:398-401.
- Chalupa V (1993) Vegetative propagation of oak (*Quercus robur* and *Q. petraea*) by cutting and tissue culture. *Ann Sci For* **501**:295–307.
- Confalonieri M, Balestrazzi A, Bisoffi S, Carbonera D (2003) *In vitro* culture and genetic engineering of *Populus* spp.: synergy for forest tree improvement. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **72**:109-138.
- Corredoira E, Valladares S, Vieitez AM (2006) Morphohistological analysis of the origin and development of somatic embryos from leaves of mature *Quercus robur*. *In vitro Cell Dev Biol Plant* **42**:525-533.
- Cuenca B, San-José MC, Martínez MT, Ballester A, Vieitez AM (1999) Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. *Plant Cell Reports* **18**:538–543.
- De la Cerda LM (1999) Encinos de Aguascalientes. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 2^{da} Edición. México. 88 pp.
- De la Paz Pérez OC, Dávalos SR, Guerrero CE (2000) Aprovechamiento de la madera de encino en México. *Madera y Bosques* **6**(1):3-13.

- El Kbiach ML, Lamarti A, Abdali A, Badoc A (2002) *In vitro* culture of axillary buds of cork oak (*Quercus suber* L.). *Bull Soc Pharm Bordeaux* **141**:73-88.
- Favre JM, Juncker B (1987) *In vitro* growth of buds taken from seedlings and adult plant material in *Quercus robur* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **8**:49-60.
- Féraud-Keller C, Espagnac H (1989) Conditions for the appearance of somatic embryogenesis on callus from leaf tissue cultures of holm oak (*Quercus ilex*). *Can J Bot* **67**:1066–1070.
- Fernandez-Guijarro B, Celestino C, Toribio M (1995) Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic embryos from leaves of *Quercus suber*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **41**:99-106.
- García-Martín G, González-Benito ME, Manzanera JA (2001) *Quercus suber* L. Somatic embryo germination and plant conversion: pretreatments and germination conditions. *In vitro Cell Dev Biol Plant* **37**:190-198.
- Gingas VM, Lineberger RD (1989) Asexual embryogenesis and plant regeneration in *Quercus*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **17**:191–203.
- Gingas VM (1991) Asexual embryogenesis and plant regeneration from male catkins of *Quercus*. *HortScience* **26**:1217–1218
- Giri CC, Shyamkumar B, Anjaneyulu C (2004) Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees* **18**:115-135.
- González-Benito ME, García-Martín G, Manzanera JM (2002) Shoot development in *Quercus suber* L. somatic embryos. *In vitro Cell Dev Biol Plant* **38**:477-480.
- González-Villarreal LM (1986) Contribución al conocimiento del género *Quercus* (FAGACEAE) en el estado de Jalisco. Instituto de Botánica. Universidad de Guadalajara. 240pp
- Hernández I, Celestino C, Alegre J, Toribio M (2003a) Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis. II. Plant regeneration from selected cork oak trees. *Plant Cell Rep* **21**:765-770.
- Hernández I, Celestino C, Toribio M (2003b) Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis. I. Factors affecting the induction in leaves from mature cork oak trees. *Plant Cell Rep* **21**:759–764.

- INEGI (2011) Mapa Digital. www.inegi.gob.mx.
- Kartsonas E, Papafotiou M (2007) Mother plant age and seasonal influence on *in vitro* propagation of *Quercus euboica* Pap., an endemic, rare and endangered oak species of Greece. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **90**:111–116.
- Kim YW, Youn Y, Noh ER, Kim JC (1997) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of five families of *Quercus acutissima*. *Plant Cell Rep* **16**:869-873.
- Kim YW, Lee BC, Lee SK, Jang SS (1994) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Quercus acutissima*. *Plant Cell Rep* **13**:315–318.
- Label P, Maldiney R, Sossountzov L, Cornu D, Migianic E (1988). Endogenous levels of abscisic acid, indole-3-acetic acid and benzyladenine during *in vitro* bud growth induction of wild cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Growth Regul* **7**:171–180.
- Luna JAL, Montalvo EL, Rendón AB (2003) Los usos no leñosos en México. *Bol Soc Bot Méx* **72**:107-111.
- Manzanera JA, Pardos JA (1990) Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **21**:1-8.
- Manzanera JA, Bueno MA, Pardos JA (1996) *Quercus robur* L. (Pedunculate Oak). En: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry 35. *Trees IV* pp. 321–341.
- Mauri PV, Manzanera JA (2003) Induction, maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.) somatic embryos. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **74**:229-235.
- Mauri PV, Manzanera JA (2004) Effect of abscisic acid and stratification on somatic embryo maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.). *In vitro Cell Dev Biol Plant* **40**:495-498.
- Merkle SA (1995) Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. *Plant Tiss. Cult. Biotechnol* **1**: 112–121.
- McVaugh R (1974) Flora novo-galiciana (*Quercus*). Contributions from the University of Michigan Herbarium, Ann Arbor, Michigan. 12, part. 1 (3):1-93.
- Montoya-Maquín JM (1966). Notas fitogeográficas sobre *Quercus oleoides* Cham. Et Schlecht. *Turrialba* **16**(1):57-66.
- Murashige T, Skoog F (1962) “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures”. *Physiol Plant* **15**:473.

- Pan MJ, van Staden J (1998) The use of charcoal *in vitro* culture - A review. *Plant Growth Regul* **26**:155–163.
- Pérez-Molphe E, Ramírez R, Núñez H, Ochoa N (1999). Introducción al cultivo de tejidos vegetales, UAA/Fomes. México. 179 pp.
- Prewin C, Wilhelm E (2003) Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). *In vitro Cell Dev Biol Plant* **39**:613–617.
- Prewin C, Vagner M, Wilhelm E (2004) Changes in water status and proline and abscisic acid concentrations in developing somatic embryos of pedunculate oak (*Quercus robur*) during maturation and germination. *Tree Physiol* **24**:1251–1257.
- Puddephat IJ, Alderson PG, Wright NA (1997) Influence of explant source, plant growth regulators and culture environment on culture initiation and establishment of *Quercus robur* L. *in vitro*. *J Exp Bot* **48**:951-962.
- Puddephat IJ, Alderson PG, Wright NA (1999) *In vitro* root induction in axillary microshoots of *Quercus robur* L. *Ann Appl Biol* **134**:233-239.
- Purohit VK, Palni LMS, Nandi SK, Rikhari HC (2002a) *In vitro* regeneration of *Quercus floribunda* Lindl. through cotyledonary nodes: an important tree of Central Himalaya. *Current Science* **833**:312-316
- Purohit VK, Tamta S, Chandra S, Vyas P, Palni LMS, Nandi SK (2002b) *In vitro* multiplication of *Quercus leucotrichophora* and *Q. glauca*: Important Himalayan oaks. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* **69**:121-133.
- Reyes JL (1995) Los bosques de encino en México: riqueza que se convierte en carbón. *Contactos* **8**:28-35.
- Rodríguez-Rivera IS, Romero-Rangel S (2007) Arquitectura foliar de diez especies de Encino (*Quercus*, Fagaceae) de México *Acta Botanica Mexicana* **81**: 9-34.
- Romano A, Noronha C, Martins-Loucao MA (1992) Influence of growth regulators on shoot proliferation in *Quercus suber* L. *Ann Bot* **70**:531-536.
- Rzedowski J (1978) Vegetación de México. Limusa. México, D.F. 432 pp.
- Rzedowski J (1991) Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana* **14**:3-21.

- Sánchez MC, San-Jose MC, Ballester A, Vieitez AM (1996) Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. *Tree Physiol* **16**:673-680.
- San-Jose MC, Vieitez AM, Ballester A (1990) Clonal propagation of juvenile and adult trees of sessile oak by tissue culture techniques. *Silvae Genet* **392**:50-55.
- San-José MC, Corredoira E, Martínez MT, Vidal N, Valladares S, Mallón R, Vieitez AM (2010) Shoot apex explants for induction of somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* L. trees. *Plant Cell Rep* **29**:661–671.
- Tamta S, Palni LMS, Purohit VK, Nandi SK (2008) *In vitro* propagation of brown oak (*Quercus semecarpifolia* Sm.) from seedling explants. *In vitro Cell Dev Biol Plant* **44**:136-141.
- Thomas T.L. (1993) Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. *The Plant Cell* **5**:1401-1410
- Thorpe TA, Harry IS, Kumar PP (1991). Application of micropropagation to forestry. En: Debergh, P.C., Zimmerman (eds.). Micropropagation. Kluwer academic publishers. Dordrecht pp. 311-336.
- Toribio M, Fernández C, Celestino C, Martínez MT, San-José MC, Vieitez AM (2004) Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **76**:283–287.
- Valencia AS (2004) Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Bo. Soc Bot Méx* **75**:33-53.
- Valladares S, Sánchez C, Martínez MT, Ballester A, Vieitez AM (2006) Plant regeneration through somatic embryogenesis from tissues of mature oak trees: true-to-type conformity of plantlets by RAPD analysis. *Plant Cell Rep* **25**:879–886.
- Vengadesan G, Pijut P (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration of northern red oak (*Quercus rubra* L.) *Plant Cell Tiss Organ Cult* **97**:141–149.
- Vieitez AM, San-José MC, Vieitez E (1985). *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L. *J Hortic Sci* **60**:99 –106.
- Vieitez AM, Pintos F, San-Jose MC, Ballester A (1993) *In vitro* shoot proliferation determined by explant orientation of juvenile and mature *Quercus rubra* L. *Tree Physiol* **12**:107-117.

- Vieitez AM, Sanchez MC, Amo-Marco J B, Ballester A (1994) Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. *Plant Cell Tiss. Organ Cult* **37**:287–295.
- Vieitez AM, Corredoira E, Ballester A, Muñoz F, Durán J, Ibarra M (2009) *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **98**:135–145.
- von Aderkas P, Bonga JM (2000) Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiol* **20**:921-928.
- Wilhelm E (2000) Somatic embryogenesis in oak (*Quercus* spp.). *In vitro Cell Dev Biol Plant* **36**: 349–357.
- Zavala CF (1990) Los encinos mexicanos: recurso desaprovechado. *Ciencia y Desarrollo XVI* **95**:43-51.
- Zavala CF (1995) Encinos Hidalguenses. Difusión Cultural. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 133 p.
- Zavala CF (1998). Observación sobre la distribución de encinos en México. *Polibotánica* **8**:47-64.



ANEXO A.

Preparación del medio de cultivo MS utilizado (Murashige y Skoog 1962).

Soluciones concentradas:

Solución A. Concentración: 1 000 X. Volumen: 50 ml

Cloruro de calcio	CaCl ₂ - 2 H ₂ O	22.000 g
-------------------	--	----------

Solución B. Concentración: 1 000 X. Volumen: 50 ml

Yoduro de potasio	KI	41.50 mg
Cloruro de cobalto	Co Cl ₂ - 6 H ₂ O	1.25 mg

Solución C. Concentración: 400 X. Volumen: 50 ml

Fosfato monobásico de potasio	KH ₂ PO ₄	3.400 g
Ac. bórico	H ₃ BO ₃	0.124 g
Molibdato de sodio	NaMoO ₄	0.005 g

Solución D. Concentración: 400 X. Volumen: 50 ml

Sulfato de magnesio	MgSO ₄ - 7 H ₂ O	7.400 g
Sulfato de manganeso	Mn SO ₄ - H ₂ O	0.340 g
Sulfato de zinc	Zn SO ₄ - 7 H ₂ O	0.172 g
Sulfato de cobre	Cu SO ₄ - 5 H ₂ O	0.50 mg

Solución E. Concentración: 200 X. Volumen: 100 ml

Sulfato ferroso	Fe SO ₄ - 7 H ₂ O	0.557 g
EDTA disódico	Na ₂ EDTA	0.745 g

Disolver ambos componentes por separado, para lo cual puede requerirse calentar. Agregar poco a poco la solución de Fe a la de EDTA y aforar. Debe de quedar de color amarillo sin precipitados.

Solución F. Concentración 100 X. Volumen: 100 ml

Glicina	20.00 mg
Piridoxina HCl	5.00 mg
Ac. nicotínico	5.00 mg
Tiamina HCl	1.00 mg
Mio inositol	1.00 g

Preparación de 1 litro de medio MS:

1. En un vaso de precipitados con unos 850 mL de agua destilada, agregar volumen indicado de las soluciones concentradas.

SOLUCION	VOLUMEN (ml)
A	1
B	1
C	2.5
D	2.5
E	5
F	10

2. Pesar, añadir y agitar hasta disolver, los siguientes compuestos:

Sacarosa	30.00 g
Nitrato de potasio	1.90 g
Nitrato de amonio	1.65 g

3. Ajustar el pH del medio a 5.7 con NaOH o HCl 0.1 N.

4. Si se trata de medio semisólido, agregar el gelificante y disolverlo calentando (se recomienda utilizar horno de microondas).

Gelificantes:	Agar	8 g/L
	Phytigel o Gelrite	2.5-3 g/L

5. Agregar los reguladores del crecimiento en caso de requerirlos (excepto aquellos que son termolábiles).

6. Aforar a 1 litro con agua destilada.

7. Distribuir en los recipientes de cultivo y esterilizar a 121 °C por 15 min.

ANEXO B.

Prueba de imprenta del artículo realizado con parte de los ensayos descritos en este trabajo.

POLIBOTÁNICA

Núm. 35, pp. 99-111, ISSN 1405-2768; México, 2013

IN VITRO PROPAGATION OF MEXICAN OAKS (*QUERCUS* SPP.)

PROPAGACIÓN IN VITRO DE PINOS MEXICANOS (*QUERCUS* SPP.)

José Silvestre Delgado-Díaz de León¹, José Francisco Morales-Domínguez¹,
María del Socorro Santos-Díaz², Eugenio Pérez-Molphe-Balch¹

¹Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. ²Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. Correo electrónico: eperezmb@correo.uaa.mx

ABSTRACT

In order to provide an alternative to conventional propagation, a protocol was developed for the *in vitro* multiplication of four Mexican species of *Quercus*, which are exploited to produce timber and coal and are nowadays threatened. Multiple shoot induction from zygotic embryos of *Quercus castanea*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa* and *Q. rugosa* cultured on Murashige and Skoog medium supplemented with 6-benzylaminopurine (BA) or kinetin is described. Results showed that both cytokinins affected shoot regeneration, where BA exhibited highest efficiency. Higher shoot proliferation frequency was observed in *Q. castanea* and *Q. eduardii* (91.7%), giving an average of 6.3 and 6.5 shoots per explant on medium with 3.0 and 4.0 mg l⁻¹ BA, respectively. For *Q. resinosa*, the best response was obtained with BA at 3.0 mg l⁻¹ producing 3.8 shoots per explant. Finally, *Q. rugosa* yielded 3.6 shoots per explant with 1.0 mg l⁻¹ BA. Shoots were excised from these edlings and transferred to half-strength medium supplemented with 10.0 mg l⁻¹ indole-3-butyric acid for two or five days, and then transfer to half-strength medium for rooting. Under these conditions, 100, 100, 66.7 and 83.3%

of the shoots of *Q. castanea*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa*, and *Q. rugosa* generated roots, respectively. Plantlets were successfully acclimated to soil in greenhouse conditions with survival frequencies of 80% for *Q. castanea*, 83.3% for *Q. eduardii*, 73.3% for *Q. resinosa*, and 70.0% for *Q. rugosa*. This *in vitro* propagation method can contribute to the production of plants for reforestation thus supporting the conservation and rational use of these species.

Key words: cotyledonary nodes, cytokinins, *in vitro* culture, micropropagation, *Quercus*.

RESUMEN

Con el fin de ofrecer una alternativa a los sistemas convencionales de propagación, se desarrolló un protocolo para la multiplicación *in vitro* de cuatro especies mexicanas de *Quercus*, las cuales son explotadas para la producción de madera y carbón y están actualmente amenazadas. Se describe la inducción de brotes múltiples a partir de embriones cigóticos de *Quercus castanea*, *Q. eduardii*, *Q. resinosa* and *Q. rugosa* cultivados en medio de Murashige y Skoog enriquecido con 6-bencilaminopurina (BA)