

Factores que inciden en el establecimiento de protocolos de micropropagación in vitro del roble andino *Quercus humboldtii* Bonpland. como estrategia biotecnológica de conservación ex situ

Diego Alexander Chipategua Español

Asesor

Manuel Francisco Polanco Puerta.

Universidad Nacional Abierta y a Distancia. UNAD

Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente. ECAPMA

Especialización en Biotecnología Agroambiental

2024

Dedicatoria

A las personas más importantes de mi vida:

Mi madre, Alicia, a la abuela María Alicia q.e.p.d , a mi hermana Paola Andrea, a Carlos
mi cuñado y mi sobrino Sebastián.

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco al todopoderoso y a la vida que me brindó de nuevo la oportunidad de retomar el sendero de la academia a pesar de las dificultades emocionales, económicas y familiares que fueron derivadas de la pandemia del COVID-19 en el año 2021.

También agradezco inmensamente a mi madre por brindarme la paciencia y el apoyo moral para lograr este objetivo profesional y personal a pesar de los quebrantos de salud que justamente la empezaron a afectar en el momento que inicié la especialización.

A mi hermana y mi cuñado por brindarme su apoyo familiar en momentos de gran dificultad durante esta especialización pues fueron quienes acompañaron a mi madre en sus tratamientos médicos cuando tenía que estar ausente por horas inclusive días con tal de lograr continuar y finalizar este proyecto.

Agradezco al Dr Manuel Francisco Polanco por su tiempo, sus consejos y su comprensión al entender que tardé más de la habitual terminado este trabajo investigativo por razones relacionadas por falta de tiempo debido a mis extenuantes jornadas de trabaj.

Agradezco a mis compañeros de especialización de quienes aprendí nuevos conocimientos en el campo de las ciencias agroambientales.

A la universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD, especialmente a los docentes de la especialización en Biotecnología Agroambiental de quienes aprendí muchos elementos no solo conceptuales, sino también lo referente a habilidades blandas necesarias en el inicio de un proceso formativo como futuro investigador y profesional en el campo de la biotecnología.

Resumen

La revisión analiza factores que afectan la micropropagación y conservación *ex situ* del roble andino *Quercus humboldtii* en condiciones *in vitro*. Se comparan protocolos de diversas especies de robles de Europa, América del Norte, Asia, Mediterráneo y Oriente Medio. Se destaca la importancia de la edad del árbol donante y el tipo de explante, utilizando técnicas como morfogénesis de novo y organogénesis. Los métodos de desinfección incluyen hipoclorito de sodio y detergente Alconox®, aunque su costo puede ser un limitante en Colombia. Se utilizan medios de cultivo como WPM y MS con reguladores de crecimiento (BAP, TDZ, AG3, auxinas) y condiciones de incubación de 20-25 °C, con fotoperíodos de 16 horas de luz. Una innovación es el uso de Tiosulfato de Plata para mejorar la supervivencia de brotes. La aclimatación para la transferencia a invernadero incluye el uso de bolsas de polietileno y fungicidas. En criopreservación, se han conservado embriones somáticos y yemas dormantes mediante vitrificación, aunque no se ha investigado en el roble colombiano. La viabilidad de tejidos criopreservados se evalúa con marcadores moleculares, señalando la necesidad de más investigaciones en criopreservación y aclimatación para la conservación de *Quercus humboldtii*.

Palabras clave: Micropropagación, *Quercus humboldtii*, *in vitro*, conservación *ex situ*, criopreservación.

Abstract

This review analyses factors affecting micropropagation and *ex situ* conservation of the Andean oak *Quercus humboldtii* under *in vitro* conditions. Protocols from different oak species from Europe, North America, Asia, the Mediterranean and the Middle East are compared. The importance of donor tree age and explant type is highlighted using techniques such as *de novo* morphogenesis and organogenesis. Disinfection methods include sodium hypochlorite and Alconox® detergent, although their cost can be a limiting factor in Colombia, using culture media such as WPM and MS with growth regulators (BAP, TDZ, AG3, auxins) and incubation conditions of 20-25°C with photoperiods of 16 hours of light. An innovation is the use of silver thiosulphate to improve shoot survival. Acclimatisation for greenhouse transfer includes the use of polyethylene bags and fungicides. In cryopreservation, somatic embryos and dormant buds have been preserved by vitrification, although this has not been investigated in Colombian oak. The viability of cryopreserved tissues is assessed using molecular markers, indicating the need for further research into cryopreservation and acclimatisation for the conservation of *Quercus humboldtii*.

Key words: Micropropagation, *Quercus humboldtii*, *in vitro*, *ex situ* conservation, cryopreservation.

Tabla de Contenido

Introducción.....	11
Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales en Conservación de Germoplasma	14
Generalidades del Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales	14
Aplicación en la Conservación de los Recursos Genéticos	15
Establecimiento de Bancos Genéticos <i>in vitro</i> Activos	17
Establecimiento de Bancos Genéticos Básicos	18
Factores que Afectan el Establecimiento de Micropropagación <i>in vitro</i> en Roble	20
Aspectos Generales	20
Selección de la Especie o Genotipo	21
Estado Fisiológico de la Planta Donante y Selección del Explante	25
Condiciones de Asepsia	29
Composición del Medio de Cultivo	38
Condiciones Ambientales de Incubación.....	45
Adaptación o Aclimatación de las Vitroplantas a Condiciones <i>ex vitro</i>	51
Bancos de Germoplasma a Partir del Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales.....	55
Criobiotecnología de Germoplasma a partir de Callos Embriogénicos y Embriones Somáticos	59
<i>Pretratamiento</i>	59
Criopreservación	62
<i>Pruebas de Viabilidad y Estabilidad Genética</i>	63
Criobiotecnología a Partir de Brotes Apicales Propagados	63

<i>Pretratamiento</i>	64
<i>Almacenamiento, Descongelamiento y Recuperación</i>	65
Criobioteología a Partir de Plúmulas Embrionarias	65
<i>Pretratamiento</i>	65
<i>Almacenamiento, Descongelamiento y Recuperación</i>	66
<i>Pruebas de Viabilidad</i>	67
Criopreservación de Embriones de Semilla.....	70
Discusión	72
Conclusiones.....	89
Recomendaciones.....	93
Referencias Bibliográficas.....	94
Apéndices	101

Lista de Tablas

Tabla 1 <i>Explantes y Técnicas de Micropropagación en Diferentes Especies del Género</i> <i>Quercus</i>	30
Tabla 2 <i>Medios de Cultivo y Composición Nutricional en Cultivo in vitro de Tejidos en</i> <i>Diferentes Especies de Roble.</i>	46

Lista de Figuras

Figura 1 <i>Procedimiento General de la Conservación de Germoplasma Vegetal Bajo Condiciones In Vitro</i>	19
Figura 2 <i>Modelo de Embrión en Estadio de Plúmula de la Especie Laelia anceps ssp Encapsulado</i>	60
Figura 3 <i>Crecimiento de Plúmulas Cultivadas de Q. rubur Después de la Crioconservación</i>	69

Lista de Apéndices

Apéndice A <i>Concentración De Sales Y Vitaminas Medio MS</i>	101
Apéndice B <i>Composición del Medio Gamborg (1968)</i>	102
Apéndice C <i>Composición del Medio Schenk- Hildebrandt (1972)</i>	103
Apéndice D <i>Composición del Medio: “Woody Plant Medium” WPM</i>	104
Apéndice E <i>Formulaciones de Medios para el Cultivo de Ejes Embrionarios en el Roble Colombiano Quercus humboltii.</i>	105
Apéndice F <i>Criopreservación Exitosa de Ejes Embrionarios en Especies de Quercus sp</i>	106
Apéndice G <i>Criopreservación Exitosa de Ejes Embrionarios en Especies de Quercus sp</i>	107

Introducción

Los bosques en general son sumideros de carbono en la tierra. Adicionalmente son escenarios naturales de sostenimiento de la biodiversidad en la tierra, enriquecen los suelos y son agentes naturales que juegan un papel importante en la regulación hídrica y climática en la biosfera. En general los bosques andinos y alto andinos son el hábitat de la especie *Quercus humboldtii* conocida como roble andino. Estos ecosistemas son grandes reservorios de biodiversidad y de endemismos en el neotrópico. Estos ecosistemas han sido objeto de fragmentación de su estructura ecológica debido a factores como: Fenómenos de aumento poblacional, deforestación, degradación, conversión de usos del suelo principalmente, por la extensión de la frontera agropecuaria, actividades mineras y el cambio climático. Asimismo, son ecosistemas altamente propensos a problemas de erosión debido a su ubicación en zonas de ladera de montaña. El roble juega un papel fundamental en la estructura ecológica de los bosques andinos en tanto que cumplen un rol importante en la creación de microclimas puesto que generan sombra para las especies del sotobosque. Así mismo, su constante defoliación contribuye a la formación de materia orgánica fundamental para el sostenimiento del ecosistema del bosque altoandino. A nivel ecológico regulan la oferta hídrica, protegen los suelos, previenen desastres naturales y es refugio de especies de fauna puesto que las bellotas o semillas sirven de alimento para diferentes especies como venados, borugos, ardillas y pájaros carpinteros.

Desde la perspectiva socioeconómica, la madera de esta especie es valorada por su buena calidad y densidad. Esto ha generado que gran parte de los bosques de roble estén desapareciendo producto de la sobreexplotación de dicho recurso o bien sea por la

expansión de la frontera agropecuaria en las zonas de robledales o por la explotación maderera. Según el libro rojo de plantas en su apartado sobre especies maderables, cataloga al roble como una especie **vulnerable** debido a las causas anteriormente mencionadas. Por lo tanto, la conservación *ex situ* en bancos de germoplasma y la propagación artificial son estrategias apropiadas como herramienta complementaria de la conservación del recurso genético del roble andino siendo entonces, la propagación y conservación de tejidos en condiciones *in vitro* clave. En este sentido, se hace una revisión literaria de protocolos de micropropagación y conservación en bancos de germoplasma en condiciones *in vitro* en diferentes especies del género *Quercus* con el fin de generar información útil para que el investigador en cultivo *in vitro* de tejidos en especies forestales pueda establecer un marco teórico a la hora de estandarizar protocolos a nivel de laboratorio que puedan *a posteriori* escalar a procesos de conservación a gran escala en bancos de germoplasma. Es de resaltar que los trabajos relacionados a propagación *in vitro* en esta especie son bastante limitados y hasta la fecha de hoy solamente se han desarrollado estudios en esta especie forestal en la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia UPTC en la ciudad de Tunja (Boyacá) en liderazgo del grupo de investigación Bioplasma de la Facultad de Ciencias Básicas (Departamento de Biología).

En el año 2005, publicaron varios estudios relacionados con embriogénesis somática en el roble Andino. Así mismo, se reporta una tesis doctoral desarrollada por Liliana Millán Orozco PhD en 2006 en la Universidad De Santiago de Compostela en España en la cual se desarrolla un protocolo de micropropagación a partir de yemas de plántulas de invernadero. Así mismo son pocos los protocolos de propagación *in vitro* en Colombia

relacionados a especies forestales. La mayoría de los trabajos citados en el presente documento corresponde a investigaciones relacionadas con micropropagación de especies europeas, asiáticas (Medio oriente e Himalaya), mexicanas y Norteamericanas. El presente documento hace énfasis en tres objetivos específicos:

Revisar los fundamentos teóricos para establecer protocolos de micropropagación *in vitro* en el roble andino *Quercus humboldti* Bonpland.

Analizar los factores que influyen en el éxito de la conservación *ex situ* de *Quercus humboldti* Bonpland a través de la micropropagación *in vitro* partiendo de protocolos desarrollados en otras especies del género *Quercus*.

Evaluar la potencialidad de la micropropagación *in vitro* como estrategia biotecnológica de conservación *ex situ* a partir del análisis de las técnicas orientadas a tal fin.

Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales en Conservación de Germoplasma

Generalidades del Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales

El cultivo *in vitro* de tejidos constituye una serie de técnicas las cuales tienen como objetivos principales: mantener, aislar y regenerar células, tejidos u órganos tanto de plantas como de animales, bajo condiciones asépticas, ambientales y nutricionales controladas. De acuerdo con Perea (2009), en los tejidos de origen vegetal, el cultivo *in vitro* permite obtener diversos cambios fisiológicos, genéticos y morfológicos con el empleo de reguladores de crecimiento como auxinas, citoquininas, giberelinas y poliaminas. Dichos cambios en los procesos metabólicos posibilitan obtener resultados de interés en el área de la biotecnología vegetal. En general, el establecimiento de un sistema de propagación *in vitro* de tejidos vegetales implica seis etapas las cuales deben ser correctamente estandarizadas con el fin de obtener éxito en el sistema de propagación a implementar. Estas básicamente son:

Selección de la especie o genotipo.

Estado fisiológico de la planta donante y selección del explante.

Condiciones de asepsia.

Composición del medio de cultivo.

Condiciones ambientales de incubación.

Adaptación de las plantas.

El segundo factor es crucial en la implementación de cualquier sistema de propagación *in vitro* puesto que la selección del explante y la técnica a emplear dependen esencialmente del objetivo del investigador o del área de interés que se esté trabajando

desde el campo de la biotecnología vegetal. Por tal razón, Pedroza (2008) menciona cinco campos de aplicación del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales las cuales son: Propagación masiva, obtención de plantas libres de patógenos, mejoramiento genético, obtención de metabolitos secundarios y conservación de germoplasma. De acuerdo con la clasificación de Muñoz (2013), las técnicas con su respectivo enfoque son:

El cultivo de fragmentos de hojas, tallos, raíces o yemas está enfocado hacia la propagación clonal de plantas.

El cultivo de meristemos apicales está enfocado a la obtención de plantas libres de patógenos

El cultivo de callos está enfocado a la obtención de semillas artificiales.

El cultivo de órganos como raíces, anteras y óvulos está enfocado al mejoramiento genético de plantas y la obtención de metabolitos secundarios.

El cultivo de protoplastos está enfocado al desarrollo de las técnicas de ingeniería genética

Aplicación en la Conservación de los Recursos Genéticos

Una de las estrategias *ex situ* que se usa con mayor frecuencia en la conservación de recursos genéticos en especies vegetales bien sea en el ámbito de agroindustria o de la silvicultura, es el establecimiento de bancos de germoplasma. Se comprende el término “*ex situ*” como una estrategia de conservación de un grupo de individuos de una población fuera de su ambiente natural (Jaramillo & Baena, 2002).

Un banco de germoplasma es un lugar o espacio en el cual, las plantas son catalogadas, conservadas para el largo plazo y puestas a disposición para distribución. Los

bancos de germoplasma son una estrategia muy atractiva para el desarrollo de programas de restauración de ecosistemas, mantenimiento de la biodiversidad y los recursos genéticos, además de reducir la contaminación ambiental. Así mismo, la importancia del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales en el establecimiento de bancos de germoplasma radica en que permite mantener por periodos prolongados y a bajas temperaturas gran cantidad de material vegetal, como plántulas, tejidos somáticos, órganos y células en espacios reducidos. Esto por supuesto representa una reducción de costos importante a la hora de establecer bancos de germoplasma (Pedroza, 2008 p.319-323).

De acuerdo con Constanza *et al.*, (2005) lo que se busca fundamentalmente es micropropagar individuos con características genotípicas superiores. Según el autor:

Los programas de mejoramiento de especies forestales normalmente incluyen métodos de propagación vegetativa con el fin de explotar al máximo la ganancia genética disponible. Esto se hace posible en la medida que lo que se busca clonar es genotipos superiores o individuos “elite”.

El procedimiento general para la conservación del germoplasma vegetal bajo condiciones *in vitro* depende fundamentalmente del tiempo de almacenaje el cual se busca mantener los tejidos (Whiters, L & Williams, 1985). Existen dos tipos de conservación *in vitro* en los bancos genéticos. Por un lado, se encuentra el denominado “*in vitro* activo”, donde fundamentalmente se mantienen los cultivos en crecimiento lento. Dicho banco, se enfoca en tiempos de almacenaje en termino corto o medio, es decir, entre 12 y 18 meses. Por otra parte, los denominados “*in vitro* básicos” los cultivos se mantienen crio preservados para almacenaje por periodos largos de tiempo.

El primer paso para iniciar un proceso de almacenamiento en bancos de germoplasma *in vitro* consiste en *establecer las técnicas de cultivo de tejidos in vitro y la selección de los explantes adecuados para tal fin*; además son las técnicas obligadas para la conservación de varios genotipos. No obstante, se sugiere que el más adecuado es el cultivo de meristemos por las siguientes razones: La probabilidad de cambios genéticos es menor, el germoplasma conservado está libre de patógenos y son, además, explantes adecuados para la micropropagación. La conservación de germoplasma mediante cultivo *in vitro* de tejidos vegetales trae consigo, algunos riesgos asociados más que todo a la inestabilidad genética. Estos, se pueden minimizar utilizando tejidos organizados (Meristemos y yemas). (Mroginski, 1993 p. 716). No obstante, Pedroza (2008) sugiere que la conservación de los genotipos se debe realizar mediante el cultivo *in vitro* de ápices caulinares o de nudos.

Establecimiento de Bancos Genéticos *in vitro* Activos

Esta metodología se fundamenta en el establecimiento de técnicas de crecimiento lento. Estas implican que se tengan que realizar diferentes subcultivos cada 4-6 semanas. Esto por supuesto resulta desde el punto de vista operativo y logístico para cualquier banco de germoplasma, un gasto enorme de recursos. Se han desarrollado varios métodos para hacer más lento el cultivo y dilatar así los intervalos de subcultivo. Dichos métodos incluyen: Almacenamiento a temperatura reducida y cambios en las condiciones de cultivo (Pedroza, 2008) (Figura 1).

Establecimiento de Bancos Genéticos Básicos

Los explantes que más se han crio preservado a -196°C según Mroginski, (1993) son: Ápices caulinares, meristemas, anteras, embriones, protoplastos, callos y suspensiones celulares. Las técnicas o pasos más comunes para crio preservación son:

Pretratamiento

Crioprotección

Congelamiento

Almacenaje

Descongelamiento

Pruebas de Viabilidad

Recultivo

La criopreservación tiene como objetivo, la conservación de tejidos en periodos de largo plazo, es decir, superiores a un año (Figura 1).

Dentro de la conservación de recursos genéticos vegetales, hay cuatro aplicaciones importantes según Ballesteros & Pritchard, (2020):

Mantenimiento de colecciones de germoplasma *in vitro* para almacenamiento a término medio.

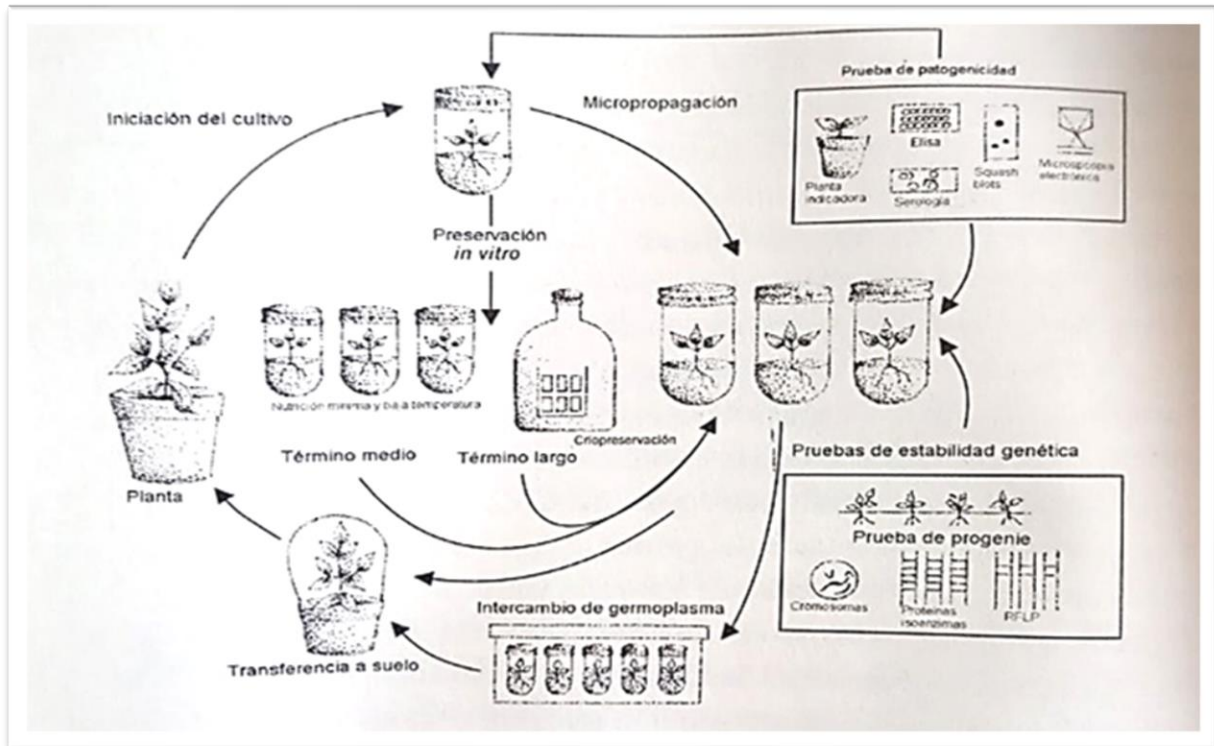
Incremento en el número de individuos de una población para usar en reintroducciones o programas de reforestación.

Suministro de ápices caulinares o embriones somáticos para criopreservación

Recuperación del crecimiento de ejes embrionarios aislados para la aplicación de protocolos de crio preservación.

Figura 1

Procedimiento General de la Conservación de Germoplasma Vegetal Bajo Condiciones In Vitro.



Nota. Tomado de Pedroza (2008. p.328.)

Factores que Afectan el Establecimiento de Micropropagación *in vitro* en Roble

Aspectos Generales

El roble andino *Quercus humboldtii* es una especie del bosque altoandino en Colombia que ha sido apreciada desde el punto de vista económico por la calidad de su madera. Esto ha traído consigo una explotación intensiva de esta especie forestal por lo cual se considera como especie en estado de vulnerabilidad. Este fenómeno lleva consigo la limitación en la producción natural de semillas en los bosques, afectando de manera directa la disponibilidad de recursos genéticos para conservar la especie. En relación con programas de reforestación, el roble andino tiene una alta capacidad para tolerar condiciones del suelo adversas, lo cual resulta ventajoso desde esta perspectiva puesto que son especies con una alta adaptabilidad a diferentes condiciones edáficas. A nivel ecológico, los robledales cumplen un rol importante en la creación de microclimas puesto que generan sombra para las especies del sotobosque. Así mismo, su constante defoliación contribuye a la formación de materia orgánica fundamental para el sostenimiento del ecosistema del bosque altoandino (Constanza, *et al.*2005).

La herramienta biotecnológica del cultivo de tejidos *in vitro* de tejidos vegetales ha permitido desarrollar programas de propagación masiva de diferentes especies vegetales de valor agronómico, etnobotánico y ecológico. La micropropagación de especies forestales actualmente es un campo promisorio debido a que este tipo de especies suelen presentar dificultades para su regeneración natural. El banco de germoplasma *in vitro* es un soporte y una herramienta para la recuperación, caracterización, propagación y conservación de

germoplasma de plantas leñosas y de especies que se encuentran en peligro de extinción. Martínez, (2005).

En Colombia, según Ramos, J (2012) son pocos los trabajos publicados en especies leñosas. No obstante, menciona algunas especies de bosques húmedos tropicales como: el abarco (*Cariniana pyriformis*), almendrón (*Terminalia catappa*), guayacán (*Tabebuia serratifolia*) y comino (*Aniba perulitis*) aliso (*Alnus acuminata*), quina (*Cinchona pubescens*), ocobo (*Tabebuia rosea*) y nogal cafetero (*Cordia alliodora*), nogal cafetero, mora (*Rubus glaucus*), escobo (*Hipericum goyanessii*), encenillo (*Weinmannia tomentosa*), rodamonte (*Escallonia myrtilloides*), guadua (*Bambusa vulgaris*), tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*), guayaba (*Psidium guajaba*), flormorado (*Tabebuia rosea*) y en teca (*Tectona grandis L*).

Selección de la Especie o Genotipo

El género *Quercus* abarca entre 400 a 600 especies distribuidas en Europa, Asia Occidental, Norteamérica y Sudamérica. En el neotrópico, México es el país que tiene la mayor cantidad de especies (Alrededor de 125). En centro américa hay cerca de 45 especies. Colombia y Cuba solamente tienen 1 especie, respectivamente. Se divide en dos subgéneros (*Quercus* y *Cycloblanopsis*) con varias secciones. Los parientes del roble andino pertenecen al subgénero *Quercus* comprende las secciones: *Leucobalanus* o los denominados “robles blancos” de Europa, Asia y Norteamérica. Algunas especies representativas son: *Quercus alba* “Roble Blanco”; *Quercus pubescens* “Roble pubescente y el *Quercus robur* “Roble común”. La sección *Mesobalanus* comprende los denominados “robles húngaros” y sus relativos de Europa, Asia y Norte de África. La sección *Cerris*

comprende a los denominados “Robles turcos” y sus relativos de Europa, Asia y Norte de África. La sección *Protobalanus* comprende a los robles intermedios y sus parientes del suroeste de Estados Unidos y el Noroeste de México. Finalmente, la sección *Lobotae* o los denominados “Robles rojos se encuentran en Norteamérica, América Central y el único espécimen de Suramérica. En este caso el Roble andino *Quercus humboldtii* (Manos & Hipp, 2021).

El genotipo de la planta donante se refiere a la predisposición que tienen las diferentes especies y genotipos vegetales de ser cultivados y mostrar respuesta en condiciones *in vitro*. Esta variación en respuesta es lo que se conoce como efecto del genotipo. (Ramirez, H., Guevara, M., Escobar-Pérez, R. 2012). Inclusive puede existir diferentes respuestas en la propagación *in vitro* a nivel de variedades y cultivares de una misma especie aun sin discriminar que pertenezcan a la misma variedad (Mroginski, L., Roca, W. 1993).

En la primeras dos décadas del Siglo XXI, se han hecho progresos significativos en la propagación clonal vía organogénesis y embriogénesis somática especialmente en las especies de Roble Europeo como *Q. robur*, *Q. petarea* y *Q. suber* (Vieitez et al., 2012).

En propagación clonal vía organogénesis en *Q. robur* se destaca el trabajo publicado por Vidal et al (2003) en el cual se realizó rizogénesis a partir de brotes clonados vía organogénesis. En dicha investigación cuyo objetivo esencial era analizar los estados de desarrollo durante la rizogénesis en brotes juveniles y maduros de dos clones de alcorneque. Como resultado, los brotes del clon Sainza reportaron bajo porcentaje de enraizamiento (2.2%) mientras que los brotes del clon NL100 presentaron un 64.7 % de

enraizamiento. Esto evidencia que, en una misma especie, la diferenciación en cuanto a genotipos influye considerablemente en la regeneración *in vitro* de tejidos en el roble.

En la propagación *in vitro* en los robles de Norteamérica Vieitez *et al* (2009) establecieron protocolo de micropropagación a partir de segmentos nodales de brotes epicormicos de árboles de 7 años de las especies *Q. rubra*, *Q. alba* y *Q. bicolor*. Un aspecto importante en esta publicación es que los tres genotipos no generaron diferencia significativa en la inducción de brotes y raíces cuando se usó el medio WPM con las mismas concentraciones de reguladores de crecimiento. En cambio, cuando se utilizó en el diseño experimental el medio WPM y el medio GD (Gresshoff and Doy, 1962) los resultados mostraron diferencias significativas en lo que se refiere tanto a proliferación de brotes nodales como radiculares. En este caso el medio WPM tuvo mejor respuesta en *Quercus rubra* y el medio GD en *Q. alba* y *Q. bicolor*. De acuerdo con lo anterior, se evidencia la sinérgica relación entre genotipo y la selección del medio de cultivo.

Dentro de los genotipos que también se ha investigado en las últimas dos décadas entorno a la aplicación de las técnicas de micropropagación *in vitro* se resalta el trabajo de Purohit, *et al* (2002) en micropropagación clonal a partir de embriones zigóticos en robles del Himalaya *Quercus leucotrichophora* y *Quercus glauca*. En el denominado “Roble de Troya o de Macedonia” Kansonas & Papafotiou (2007) realizaron un estudio de micropropagación a partir de nodos cotiledonares en esta especie. Otro trabajo para destacar en Latinoamérica es el de Delgadillo-Diaz de León, J *et al* (2013) en las especies emblemáticas de roble en México a partir de micropropagación de embriones zigóticos. En el roble Colombiano *Quercus humboldtii* Bondpland, se ha investigado sobre la

micropropagación y organogénesis clonal a partir de brotes de yemas procedentes de individuos de dos meses de edad. (Millán Orozco, 2006). Entre tanto, Constanza *et al* (2005) desarrollaron en esta especie, un cultivo de embriones zigóticos a partir de ejes embrionarios cigóticos maduros e inmaduros con el fin de evaluar el efecto de la citoquinina TDZ (Tidiazuron) en la producción y maduración de embriones somáticos.

En el *Quercus ilex* o encina Europea se ha realizado embriogénesis somática a partir de óvulos aislados de integumentos de flores femeninas de árboles maduros. En un estudio realizado por Barra-Jiménez et al., (2014) en embriogénesis somática de este tipo de explantes se realizaron dos experimentos en los cuales se buscaba como objetivo principal evaluar el efecto del genotipo en la embriogénesis somática en *Quercus ilex*. En el primer ensayo se evaluó las variables: Efecto del estado de desarrollo de las flores, concentración de reguladores de crecimiento y genotipo. En el segundo ensayo se evaluó: Influencia en el estado de desarrollo de las flores, el genotipo y la formulación de macronutrientes (Medio Gamborg vs Medio Schenk and Hildebrandt). En lo que respecta al efecto del genotipo, la inducción de embriogénesis somática fue lograda en cuatro de los cinco genotipos evaluados los cuales correspondían a robles de El Encino (España). No obstante, la frecuencia fue muy baja. Sin embargo, la influencia del medio G y el no uso de reguladores de crecimiento en dichos genotipos influyó en el incremento de la embriogénesis somática del 0.8% al 2.3 %. En el caso de los explantes provenientes de los genotipos obtenidos en la región de Quintos de Mora, la inducción de embriogénesis somática fue del 0.8% sin importar la fórmula de macronutrientes utilizada (Medio G o Medio SH con o sin reguladores de crecimiento). Es decir, que el genotipo influyó de manera significativa en la

embriogénesis somática. Finalmente, en este estudio se evaluó la influencia del genotipo en la germinación y conversión en plántulas de los embriones somáticos obtenidos. De acuerdo con el estudio, dichas respuestas fueron obtenidas con todos los genotipos evaluados. Sin embargo, cabe destacar que la frecuencia de embriones que permanecieron detenidos en su desarrollo varió con el genotipo. (14% en el genotipo Q8 y 45% en el genotipo B6. Estos resultados indican la fuerte influencia del genotipo a la hora de regenerar plántulas a partir de embriones somáticos en el roble.

En países de medio oriente y sus especies de roble también se han reportado trabajos relacionados a micropropagación *in vitro* de manera reciente. Por ejemplo, Toma F, (2020) reportó micropropagación a partir del cultivo de embriones en la especie *Quercus aegilops* L.

Estado Fisiológico de la Planta Donante y Selección del Explante

Los explantes provenientes de plantas más jóvenes suelen tener mayor capacidad de regeneración que aquellos provenientes de plantas adultas. Esto se evidencia con mayor claridad en especies forestales. (Ramirez, Guevara, & Escobar, 2012). Otro factor que puede alterar los explantes es la época de año en la que se realizan los cultivos o también, si estos se obtienen de plantas de invernadero o campo. Así mismo, los pretratamientos y las condiciones de crecimiento de las plantas donantes (Mroginski & Roca, 1991).

En una investigación realizada por (Vidal et al., 2003) en el roble común Europeo *Q. robur* se evaluó el efecto de la edad de la planta madre en el enraizamiento de brotes clonados de la parte basal y la copa de árboles maduros de *Q. robur*. los cuales pertenecían a dos clones. El clon Sainza cuya principal característica es que corresponde a especímenes

arbóreos de 300 años promedio y el clon NL100 cuyo promedio de edad era de 100 años. Como resultados obtenidos, los brotes de la parte basal en ambos clones tuvieron mayor capacidad de enraizamiento confirmando mayor grado de estado juvenil del material de la parte basal. Así mismo, los brotes obtenidos del clon Sainza tuvieron un bajo porcentaje de enraizamiento (2.2%) en comparación al 64.7% del clon NL100. Esto evidencia la fuerte influencia de la edad de la planta donadora en el enraizamiento *in vitro* de ambos clones de alcornoque. Finalmente, al hacer el estudio histológico de los brotes radiculares obtenidos se concluyó que los brotes de la parte basal presentaban características de tejido meristemático dando lugar a meristemoides y primordios de raíz. Esta diferenciación celular no se pudo observar en los brotes de corona. Así mismo, se comprobó que la concentración endógena de AIA en los primeros días de enraizamiento no es un factor limitante en los explantes de los brotes de corona sino simplemente se debe a la edad de estos.

En otro estudio realizado por (Kartsonas & Papafotiou, 2007) se evaluó el efecto de la edad de la planta madre y la influencia estacional en la propagación *in vitro* del roble de macedonia *Quercus euboica*. En el ensayo se tomaron explantes de plántulas y de plantas adultas en tres diferentes fechas del año. A inicios de Mayo, inicios de Julio y a mediados de Septiembre. El experimento fue repetido una vez en dos años consecutivos. Como resultados encontraron que los explantes provenientes de plántulas produjeron más brotes que los que provenían de plantas adultas. Así mismo, encontraron que la capacidad de formación de brotes se redujo en Julio en comparación al mes de Mayo. En el mes de Septiembre se registró la media más baja en la regeneración de brotes. Esta tendencia

también fue más evidente en los brotes provenientes de explantes adultos. El lapso entre Mayo y Julio mostró un decrecimiento significativo de regeneración de brotes en estos explantes indicando que la tasa de crecimiento en plantas adultas cesa al inicio del verano en comparación a las plántulas. Este estudio resalta la influencia que pueden tener la época del año en la micropropagación del roble. En el caso de los países del trópico da luces para evaluar que tanto influye la época de sequía o lluvias o algún tipo de estacionalidad del clima en la micropropagación *in vitro* en el roble. Así mismo, dicho estudio menciona la importancia de mantener las plántulas donantes en óptimas condiciones fitosanitarias que abarcan desde el control de hongos e insectos parásitos hasta el uso de compostaje complementado con suelo rizosférico.

El porcentaje de supervivencia de yemas obtenidas de plántulas de diferentes edades obtenidas en invernadero influye en dicho parámetro en el roble colombiano *Quercus humboldtii*. De acuerdo a (Millán Orozco, 2006) el porcentaje de supervivencia de las yemas al tercer mes de subcultivo fue de 79.16% en las yemas de plantas donantes de dos meses de edad, y 66.66% en yemas de plantas donantes de seis meses de edad.

El estadio de desarrollo de las flores y frutos ha sido evaluado como un factor importante en la embriogénesis somática de la encina del mediterráneo *Quercus ilex*. Se colectó dicho material vegetal entre los meses de Junio y Julio en tres tamaños o estadios diferentes. Estos fueron: (i) Flores femeninas antes de la fertilización con un diámetro menor a 5 mm con los seis óvulos dentro del ovario teniendo el mismo tamaño; (ii) flores después de la fertilización de 6-7 mm de diámetro con uno de los óvulos visiblemente predominante; (iii) bellotas inmaduras de 8-9 mm de diámetro con el ovulo desarrollado

ocupando enteramente la cavidad del ovario. Se realizaron dos experimentos en los cuales se evaluaba la embriogénesis somática a partir de la combinación de los factores: Estadios de desarrollo (anteriormente mencionados), genotipo, Presencia o ausencia de reguladores de crecimiento y medio de cultivo (Medio G vs SH). Como resultados, la embriogénesis somática se logró exclusivamente con los óvulos extraídos del tercer estadio de desarrollo. Las flores colectadas de los primeros estadios produjeron una alta exudación de compuestos fenólicos, dando como consecuencia, necrosis del explante.

Específicamente, los del primer estadio produjeron en las primeras semanas callo blanquecinos y a los tres meses se volvieron necróticos. En los del segundo estadio de desarrollo se presentó un promedio de contaminación del 32% y un 20% de dichos óvulos formaron embriones cigóticos (Barra-Jiménez et al., 2014).

Una de las investigaciones más importantes en embriogénesis somática en roble Colombiano fue desarrollada por Constanza & *et al.*, (2005). Los parámetros fisiológicos tomados como referencia al momento de la colección del material vegetal fueron el estado fitosanitario y la facilidad para la recolección de las semillas. En este último, específicamente se colectaron tres tipos de semillas: Inmaduras, en proceso de desarrollo y semillas maduras. Se realizaron 9 ensayos diferentes para evaluar embriogénesis somática. Tres de estos relacionan de forma más directa al estado de desarrollo de las semillas. En uno de los ensayos, se realizó cultivo de embriones zigóticos inmaduros en estado cotidelonar en presencia de diferentes concentraciones de reguladores y glutamina. Se tomaron semillas inmaduras de 1 a 2 cm de largo y 1.5 cm de diametro (tamaño pequeño), color verde claro y caliz escamoso de color gris cubriendo casi toda la semilla.

Como resultado, todos estos embriones cotiledonares durante la etapa de estimulación-expresión desarrollaron procesos embriogénicos en todos los tratamientos con reguladores de crecimiento y glutamina. En otro ensayo similar, se utilizó reguladores de crecimiento y caseína hidrolizada 500 mg/L. En todos los tratamientos, la mayoría de explantes estimulados presentaron embriogénesis somática.

En un estudio realizado por Toma, F (2020) en el roble del mediterráneo *Quercus aegilops L.*, uno de los factores que se analizó fue el efecto de la propagación clonal a partir de cultivo de embriones con pre-tratamiento en frío de las bellotas. (Prueba de estratificación). En dicho ensayo, las bellotas fueron lavadas con agua de grifo para luego ser almacenadas en refrigerador a 5° C en periodos de tiempo de 1,2,3 y 4 semanas. Como resultado, la tasa de germinación incrementó durante el período de estratificación de dos semanas. Posterior a este tiempo, la tasa decreció. En conclusión, en el caso del cultivo de embriones, un factor importante a considerar es establecer el tiempo de estratificación en frío de las semillas previo al establecimiento de la metodología de cultivo *in vitro* de embriones.

En Tabla 1. se especifica los explantes y los genotipos empleados en algunos trabajos publicados desde el año 2002 hasta la presente fecha.

Condiciones de Asepsia

La asociación explante-medio constituye un ambiente propicio para la incubación de diferentes microorganismos los cuales pueden destruir los medios de cultivo al competir por recursos dentro del mismo cultivo. Los compuestos químicos que se utilizan con mayor frecuencia como desinfectantes para los explantes son: Etanol al 70% v/v y de Hipoclorito

de Sodio (NaOCl) en concentraciones que oscilan entre el 1% y el 3%. Con menor frecuencia se usa el Hipoclorito de Calcio [Ca (OCl)₂ en concentraciones entre el 6% y 12%] y el Cloruro de mercurio (HgCl₂ en concentraciones entre el 0.1 a 1.5%) aunque hay que recalcar que este compuesto suele ser altamente tóxico. En algunas ocasiones se adiciona en los protocolos de asepsia, el agente tensoactivo Tween 20 o Tween 80 en concentraciones del 0.01% al 0.1%, sin embargo, es innecesario si los protocolos de asepsia incluyen desinfección con etanol al 70% en el primer paso. (Mroginski & Roca, 1991). A continuación, se mencionan algunos protocolos de desinfección propuestos en cultivo *in vitro* de tejidos en diferentes especies del género *Quercus*.

Tabla 1

Explantos y Técnicas de Micropropagación en Diferentes Especies del Género Quercus

Genotipo	Técnica utilizada	Explante Utilizado	Referencia
<i>Quercus leucotrichophora</i> "Roble banjh del Himalaya	Micropropagación o multiplicación clonal.	Embriones intactos de semillas decapadas	(Purohit, et al., 2002)
<i>Quercus glauca</i> Roble azul Japonés		Nodos cotidelonares o primarios sin radícula.	
<i>Quercus rubur L</i> Roble común Europeo	Rizogénesis a partir de brotes clonados vía organogénesis	Brotos clonados a partir de la parte basal y la copa de <i>Q. rubur</i>	(Vidal et al., 2003)
<i>Quercus humboltii</i> Roble Colombiano.	Micropropagación	Yemas apicales y nudos de plántulas de 2 meses de edad	(Millán Orozco, 2006)

<i>Quercus humboldtii</i> Roble Colombiano	Cultivo de Embriones Zigóticos	Ejes embrionarios Zigóticos maduros e inmaduros.	(Constanza et al., 2005)
<i>Quercus euboica</i> Roble de troya o de Macedonia.	Micropropagación	Explantos nodales	(Kartsonas & Papafotiou, 2007)
<i>Quercus rubra L</i> Roble común	Micropropagación	Explantos nodales	(Vengadesan & Pijut, 2009)
<i>Quercus rubra L</i> Roble común	Micropropagación	Brotos primordiales y segmentos nodales aislados de brotos epicormicos de árboles de 7 años.	(Vieitez et al., 2009)
<i>Quercus alba</i> Roble blanco	Micropropagación	Brotos primordiales y segmentos nodales aislados de brotos epicormicos de árboles de 7 años.	(Vieitez et al., 2009)
<i>Quercus bicolor</i> Roble Bicolor	Micropropagación	Brotos primordiales y segmentos nodales aislados de brotos epicormicos de árboles de 7 años.	(Vieitez et al., 2009)
<i>Quercus castanea</i> Encino capulincillo de México	Micropropagación	Cultivo De embriones zigóticos	(Delgadillo-Díaz, et al., 2013)
<i>Quercus eduardii</i> Encino manzano de México	Micropropagación	Cultivo De embriones zigóticos	(Delgadillo-Díaz, et al., 2013)
<i>Quercus resinosa</i> Encino amarillo de México	Micropropagación	Cultivo De embriones zigóticos	(Delgadillo-Díaz, et al., 2013)

<i>Quercus rugosa</i> Encino quiebra hacha de México	Micropropagación	Cultivo De embriones zigóticos	(Delgadillo-Díaz, et al., 2013)
<i>Quercus ilex</i> Encina o chaparro	Embriogénesis somática	Óvulos aislados de integumentos de tejidos de flores femeninas de árboles maduros.	(Barra-Jiménez et al., 2014)
<i>Quercus aegilops L</i> Robles de Norteamérica	Micropropagación.	Cultivo de embriones.	(Fadladeen & Toma, 2020)
<i>Quercus alba</i> <i>Quercus bicolor</i> <i>Quercus macrocarpa</i> <i>Quercus muehlenbergii</i> <i>Quercus palustris</i>	Micropropagación	Brotos juveniles de menos de 1 cm sin hojas expandidas o endurecidas	(Winkeljohn et al., 2022)

En multiplicación clonal a partir de embriones maduros de semillas de los robles del Himalaya *Quercus leucotrichophora* y *Quercus glauca* el protocolo de desinfección consistía en separar la cúpula de la semilla humedecida en 100 mL de solución de detergente (Labolene, 0.1%, v/v; 10 minutos), luego lavar con agua de grifo por 5 minutos. Posteriormente, enjuagar las semillas cuatro veces en agua destilada y luego tratarlas con la solución de fungicida Bavistin®, 0.2 % w/v combinada con ácido Ascórbico al 0.02% w/v por 30 minutos. Finalmente, desinfectar la superficie con solución acuosa de cloruro de Mercurio (HgCl al 0.05% w/v por 10 minutos). Cada tratamiento fue seguido de cuatro lavados en agua destilada estéril bajo condiciones asépticas (Purohit, 2002).

En el roble Colombiano, Constanza, E *et al.*, (2005) proponen protocolos de desinfección para semillas en diferentes estadios de desarrollo las cuales serán utilizadas como explante en inducción de embriogénesis somática en *Quercus humboldtii*. Para las semillas inmaduras, se separa el caliz y las semillas lavando varias veces con agua corriente. En cámara de flujo laminar, las semillas se tratan con una solución de Hipoclorito de Sodio (NaClO 5.25% al 50% v/v) mas tween 20 (0.1 mL/100mL) (v/v) durante 15 minutos. Finalmente, se enjuagan tres veces consecutivas en agua destilada estéril. Los embriones zigóticos inmaduros en estado cotiledonar se obtienen haciendo cortes longitudinales eliminando la testa. Con ayuda de un estereoscopio se extrae el saco embrionario escindiendo este con un corte transversal o longitudinal para dejar libre el embrión. Para el caso de las semillas en desarrollo y maduras se elimina la testa para dejar los cotiledones descubiertos. Con ayuda de un bisturí se hacen cortes longitudinales a los cotiledones para tallar una estructura semejante a un cono con una altura aproximada de 10 mm quedando el embrión hacia un vertice de este. Estos conos en cabina de flujo laminar se enjuagan tres veces consecutivas con agua destilada esteril, luego se tratan con alcohol al 70% durante un minuto, seguido de Hipoclorito de Sodio (NaOCl 5.25%) al 50% (v/v), Tween 20 (0.1 mL/100 mL) (v/v) durante 15 minutos. Finalmente los conos se enjuagan tres veces en agua destilada esteril. Se eliminan los “conos” quedando las porciones cotiledonares en posición vertical en cada uno de los recipientes con el medio de cultivo. Finalmente, para el caso de las semillas almacenadas, el protocolo es similar al de las semillas maduras; solamente que una vez eliminada la testa, se retira los tejidos superficiales de los cotiledones y se realiza una primera asepsia, seguida del proceso de

tallar “los conos”. En un ensayo realizado por dichos investigadores, se evaluó el efecto que puede tener el almacenamiento en frío por 20 días a 4° C combinado con un proceso de asepsia de sencillo o doble (Es decir una sola ronda o dos de enjuague en agua destilada esteril). Como resultado, hallaron que la asepsia superficial doble parece afectar negativamente la viabilidad de los ejes embrionarios evidenciándose necrosis en dichos embriones. Así mismo, aquellas semillas almacenadas a las cuales se les aplicó un proceso de asepsia superficial sencilla, la contaminación aumentó de forma considerable. Por lo tanto, se concluyó que el procedimiento de asepsia superficial de semillas de *Q.humboldtii* es más efectivo ya que permite eliminar totalmente los contaminantes exógenos.

En un protocolo de micropropagación a partir de segmentos nodales en el roble de troya en peligro de extinción *Quercus euboica*, los esquejes del tallo apical de tamaño entre 5-7 cm fueron defoliados y lavados con agua de grifo por 15 minutos, en seguida fueron superficialmente esterilizados en una solución al 15 % (v/v) de Hipoclorito de sodio 4.6% w/v la cual contenía unas pocas gotas de tween-20 por 15 minutos. Finalmente, cada tallo apical, se enjuagó cuatro veces por tres minutos en agua destilada esteril (Kartsonas & Papafotiou, 2007).

En otro protocolo de micropropagación a partir de nodos cotiledonares en el roble rojo de Norteamérica *Quercus rubra L*, la asepsia de los explantes inició con el protocolo de desinfección de las bellotas maduras propuesto por Vengadesan & Pijut, (2009) el cual consta de tres pasos:

Lavado vigoroso en una solución de 1% w/v de Alconox ®, seguido de detergente por 20 minutos y tres lavados (3 minutos cada uno) con agua destilada esteril.

Desinfección con etanol al 70% (v/v) por tres minutos, seguido nuevamente por tres enjuagues de tres minutos cada uno en agua destilada esteril.

Desinfección superficial con una solución de 30% (v/v) de Hipoclorito de Sodio (NaClO_3 al 5.25%) y tres gotas de Tween 20 por 20 minutos finalizado con tres enjuagues en agua destilada esteril.

Una vez finalizado el anterior protocolo, el pericarpo se remueve asepticamente. Nuevamente las bellotas se desinfectan con etanol al 70% por 1 minuto, enjuagar tres veces con agua destilada esteril (cada uno de tres minutos). Finalmente se hace una desinfección con una solución al 20% de blanqueador comercial (Hipoclorito de Sodio NaClO_3 al 5.25%) más tres gotas de Tween 20 por 15 minutos y enjuague de cinco veces en agua destilada esteril de tres minutos cada uno (Vengadesan & Pijut, 2009).

En protocolos de micropropagación en especies de roble de Norteamérica a partir de brotes primordiales y segmentos nodales aislados de brotes epicormicos de arboles de 7 años el protocolo de desinfección consiste en cortar segmentos de 20 a 25 cm de largo de la parte proximal de las ramas (1 a 2 cm de espesor). Colocarlos en posición vertical en perlita humedecida siendo estos constantemente enjuagados en una camara de crecimiento a 25° con 80 a 90% de humedad relativa. Una vez enjuagados, los brotes de 3 a 10 cm de largo se deshojan y sus superficies se desinfectan en imersion durante 20 segundos en etanol al 70%, seguido de 8 minutos en una solución de cloro libre al 0.6% (Cloro Milipore®) la cual tiene adicionado 2 a 3 gotas de Tween 80®, finalizando con un enjuague en agua destilada (Tres veces). Cabe resaltar que este protocolo reportó en el estudio, tasas de contaminación muy bajas en todos los genotipos de *Q. rubra*; *Q. alba* y

Q.bicolor . Según los autores, esto se debe a que los brotes inicialmente se cultivaron en cabina de crecimiento (Vieitez et al., 2009).

En el protocolo de micropropagación a partir de embriones zigóticos en robles mexicanos de las especies *Quercus castanea*, *Quercus eduardii*, *Quercus resinosa* y *Quercus rugosa*; el protocolo de desinfección consistió en separar las cúpulas de las bellotas y enjuagarlas vigorosamente con agua de grifo. Se lavan tres veces por 5 minutos con jabon líquido Dermoclean® 1% (v/v) y se enjuagan con agua de grifo. Posterior a ello, se tratan con etanol al 70% v/v por 1 minuto seguido por un enjuage con agua de grifo y desinfección de la superficie con una solución al 20% (v/v) de Hipoclorito de Sodio al 5.25% por 25 minutos. Finalmente, se enjuagan tres veces con agua destilada esteril bajo condiciones asépticas. Una vez que se les retira la cubierta de las semillas a las bellotas desinfectadas, los embriones intactos (Semillas sin cubierta) se tratan por 20 minutos con 0.1% (v/v) de PPM (Plant Preservative Mixture Reagent) y una mezcla de antioxidante al 0.01% w/v de ácido ascorbico y ácido cítrico filtrado y esterilizado (Delgadillo-Díaz, 2013).

En un protocolo de inducción de embriogénesis somática a partir de ovulos aislados de integumentos provenientes de flores femeninas de arboles maduros de encinos españoles *Quercus ilex* se realizó esterilización superficial de las flores enteras (Incluyendo cúpulas) de los dos tamaños más pequeños de flores (< 5 mm o entre 5 a 7 mm). Estas se agitaron vigorosamente en etanol al 70% por 30 segundos seguido por una inmersión en una solución al 15% de hipoclorito de Sodio (3.5% de Cloro Activo) más dos gotas de Tween 20 por 10 minutos, seguido por tres lavados en agua destilada estéril.

Este método de doble esterilización fue aplicado a todos los materiales colectados en dos años consecutivos. Cabe resaltar que en esta investigación, la tasa de contaminación se asoció más con el estadio de desarrollo de las flores más no por el protocolo de desinfección. En flores con ovulo fertilizado con una tamaño alcanzado de 3 a 4 mm de anchura y 5-6 mm de longitud se presentó una tasa de contaminación por debajo del 3% (Barra-Jiménez et al., 2014).

En un estudio realizado por Fadladeen & Toma, (2020) sobre micropropagación a partir de cultivo *in vitro* de embriones en la especie de roble del medio oriente *Quercus aegilops L* se realizó un ensayo independiente en el cual se evaluó la efectividad de los protocolos de desinfección en la obtención de explantes saludables. El diseño experimental consistió en determinar diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO₅.25% w/v) en contraste con distintos períodos de tiempo. Como resultado, se obtuvo 100% de cultivos saludables y asépticos cuando se utilizó una concentración de Hipoclorito de Sodio al 30% v/v y dos gotas de tween 20 por 5 minutos; finalizando con tres enjuagues de tres minutos cada uno en agua destilada estéril. Así mismo, es importante recalcar que el protocolo que utilizó una concentración de Hipoclorito de Sodio al 45% por 5 minutos causó un notable daño en los embriones cultivados, generando respuesta nula al proceso germinativo en estos.

En una reciente investigación propuesta por Winkeljohn *et al.*, (2022) para las especies de Roble de Norteamérica: *Quercus alba*, *Quercus bicolor*, *Quercus macrocarpa* y *Quercus muehlenbergii* se aplicó un protocolo de desinfección el cual consistía en que dichos brotes se agitan en una dilución 1:10 de Blanqueador comercial (Hipoclorito de

Sodio al 5.25% w/v) con 0.05% de tween 20 durante 10 minutos. En seguida, los brotes se enjuagaron en agua destilada esterilizada en autoclave por ósmosis inversa. Los extremos de los brotes fueron eliminados y blanqueados para homogenizarlos (Hasta Aproximadamente 1 cm). Es de mencionar que este mismo estudio implementó el Tiosulfato de Plata en micropropagación de roble con el fin de mejorar las condiciones nutricionales del medio de cultivo estandarizado para el protocolo de micropropagación de las especies anteriormente mencionadas sin que ello se relacione directamente con el protocolo de asepsia de los explantes. No obstante, se ha mencionado en líneas anteriores la correspondiente metodología de asepsia de los explantes usados en el estudio.

Composición del Medio de Cultivo

Según Ramirez, Guevara, & Escobar (2012), un medio de cultivo *in vitro* de plantas consta de cuatro componentes básicos:

Macro y micronutrientes presentes en forma de sales inorgánicas.

Compuestos orgánicos. (Carbohidratos, reguladores de crecimiento y vitaminas/aminoácidos).

Suplementos orgánicos de composición no definida usados en regeneración de explantes recalcitrantes (Extracto de levadura, Agua de coco extracto de Malta, Caseína hidrolizada y jugo de tomate).

Agentes gelificantes. (Agar, gelificantes comerciales como Phytigel®, Bactoagar®, Gelrite®, entre otros).

Las concentraciones de macro y micronutrientes cambian de acuerdo al medio basal; en el caso del medio Murashige and Skoog (MS;1962) se especifican en el

Apéndice A. Este medio es utilizado en la etapa de estimulación -expresión por 30 días en la embriogénesis somática en el roble Colombiano. *Q. humboldtii*. El medio basal MS con diferentes concentraciones de reguladores y suplementado con glutamina, caseína hidrolizada o ambas combinadas, facilita la inducción de procesos embriogénicos. No obstante, la presencia de la citoquinina TDZ y la caseína hidrolizada han generado en esta especie, los mayores porcentaje de explantes embriogénicos en embriones cotiledonares seguido del medio MS + 2.0 mg/L⁻¹ AIA + 0.2 mg/L⁻¹ KIN + 0.1 mg/L⁻¹ de BAP. En lo que respecta al alcance de los estadios de desarrollo embrionario más avanzados (Torpedo y cotiledonar) durante 30 días de etapa de estimulación-expresión, se logró con la combinación del medio MS con la auxina AIB y las citoquininas KIN y TDZ. Así mismo, se logró en menor tiempo de estimulación-expresión, el alcance de todos los estadios de desarrollo cuando se utilizó el medio MS+ TDZ 0.005 mg/L con aproximadamente un 32% de regeneración de estos embriones en plántulas. Finalmente, las condiciones de oscuridad a la que fueron expuestos los explantes favoreció la inducción del proceso embriogénico en todos los ensayos realizados (Constanza, 2005). Tabla No 2.

En el roble común de Norteamérica *Q. rubra L*, el medio MS se reporta en la multiplicación *in vitro* de brotes provenientes de nodos cotiledonares.(Vengadesan & Pijut, 2009). En las especies de robles mexicanos se reporta el Medio MS en la inducción y multiplicación de brotes a partir de embriones intactos. No obstante, en el enraizamiento a partir de los microbrotes obtenidos en la etapa anterior, se utilizó la mitad de las concentración de las sales de este mismo medio (Delgadillo-Díaz, 2013).

El medio MS ha sido base para la formulación de otros medios de cultivo. Por ejemplo, en clonación de robles maduros del mediterráneo *Q. ilex* se evaluaron el efecto de dos formulaciones derivadas de la concentración de micronutrientes del medio MS en la inducción de embriogénesis somática. Al respecto, Barra-Jiménez et al., (2014) evaluaron el efecto de los macronutrientes del medio SH (Schenk and Hildebrandt 1972) y G (Gamborg, 1968). (Apendice B y C). Ambos medios mantienen las mismas concentraciones de micronutrientes y vitaminas del medio MS con algunas pequeñas modificaciones en la concentración del agar (6 g/L^{-1}) y de sacarosa (30 g L^{-1}). Dichos autores mencionan que para la germinación de los embriones somáticos se utilizó una variación del medio MS la cual consiste en adicionar 30 g/L^{-1} de Sacarosa, 0.02 g/L^{-1} de ácido ascórbico, 10 g/L^{-1} de Carbón activado y 6 g/L^{-1} de agar. Los resultados obtenidos en esta investigación afirman que el medio con la concentración de macronutrientes SH generó mejor respuesta en la inducción de embriogénesis somática.

El medio WPM por sus siglas en Inglés "**Woody Plant Medium**" propuesto por Lloyd and McCown, (1980) (Apendice D) se reporta su uso en la germinación de embriones intactos y en el enraizamiento en brotes obtenidos a partir de dichos explantes en los robles del Himalaya. *Q. leucotrichophora* y *Q. glauca*. Este medio reportó mayor frecuencia de formación de brotes en comparación al medio MS siendo más efectivo tanto en proliferación como en la longitud de los brotes obtenidos a partir de nodos cotiledonares. Así mismo, en la mitad de concentración de sus sales ($1/2$ WPM) presentó 90% de enraizamiento en brotes de *Q. leucotrichophora* y 100% en *Q. glauca* (Purohit, 2002). (Tabla No 2.)

En el roble Colombiano *Q. humboldti*, el medio WPM facilitó la germinación de embriones zigóticos maduros e inmaduros durante la fase de subcultivo siendo evidente al final de dicha etapa, la presencia de embrioides en los estados de torpedo y cotiledonar siendo este último el de mayor cantidad de estructuras embrioidales al final de esta fase. En este caso, la composición nutricional que favoreció dicho resultado fue WPM combinado con la auxina AIB y las citoquininas KIN TDZ (Constanza, 2005). (Tabla No 2)

En micropropagación de explantes nodales, el medio WPM suplementado con 100 mg/L de Mioinotisol + 1 mg/L Tiamina + 0.5 mg/L piridoxina + 0.5 mg de ácido Nicotínico y 4.44 μM de BAP obtuvo mejores resultados en la formación y multiplicación de brotes a partir de explantes nodales en el Roble de troya o Macedonia *Quercus euboica*. En la fase de enraizamiento, la concentración de 9.84 μM de AIB por 8 días en frascos cubiertos seguida de transferencia a medio libre de reguladores de crecimiento obtuvo mejores resultados durante dicha etapa. (Kartsonas & Papafotiou, 2007). A partir de este mismo tipo de explantes, el Medio WPM + 4.4 μM de BAP + 0.29 μM de Ácido Giberélico (GA_3) y 500 mg/L de sacarosa reportó alta proliferación de yemas en el Roble común *Q. rubra L* (Vengadesan & Pijut, 2009). En brotes primordiales y segmentos nodales de brotes epicormicos de árboles de roble Europeo de 7 años de *Q. rubra L*. Vieitez *et al.*, (2009) reportaron proliferación de brotes a partir de la ubicación de dichos explantes en forma horizontal en medio WPM + BAP (0.88-0.44 μM) + AgNO_3 (3mg/L) y enraizamiento con $\frac{1}{2}$ WPM + AIB (122.5 μM) + Carbón activado (0.4%) por 48 horas.

En el roble de medio oriente o de Turquía *Q. aegilops L* , Fadladeen & Toma, (2020) reportan mejor porcentaje de germinación de embriones al adicionar al medio WPM AG₃. Como resultado obtuvieron 82.25% de germinación de dichos embriones. Así mismo, la adición de 4.5 mg/L⁻¹ de BAP mejoró la longitud de los brotes regenerados a partir de embriones. Al adicionar ANA en concentración de 1.0 mg/L⁻¹ durante el enraizamiento, se generaron 6 raíces por explante y 100% de porcentaje de enraizamiento.

La formulación de macro y micronutrientes del medio propuesto por Gresshoff and Doy (1972) conocida como medio GD ha sido reportado por (Vidal et al., 2003) en rizogénesis a partir de brotes clonados de la parte basal y la copa del roble común Europeo *Quercus rubur L*. Específicamente la formulación de Medio GD + 30 g/L⁻¹ de sacarosa + 6.5 g/L⁻¹ agar y 0.44 μM de BAP se reporta en diferentes subcultivos de líneas de brotes establecidos *in vitro* a partir de la parte basal y la corona de clones de 100 y 300 años de edad de *Q. rubur L*. Así mismo, en el enraizamiento de los brotes obtenidos con una longitud de 20 mm fueron colocados en medio GD con 1/3 de la concentración normal de macronutrientes del medio basal con 5.5 g/L⁻¹ de agar suplementado con 0.12 mM de AIB. (Ver Tabla No 2). En este mismo estudio se evaluó el efecto de NPA por sus siglas en inglés "*Naphthylphthalamic acid*" como suplemento al medio de enraizamiento anteriormente mencionado. Para ello, los investigadores adicionaron 10 mL de una solución acuosa esterilizada por filtración de 200 μM NPA. Como resultados obtenidos. La formación de raíces es relativa en cada explante según las concentraciones de auxina. En este caso, AIB (Ácido indol butírico) y Ácido Naptalacético (ANA). Esta última auxina incrementa la concentración endógena de AIA (ácido indolacético) en brotes de copa. Así

mismo, la presencia de NPA afectó la capacidad de enraizamiento y retrasó el inicio del enraizamiento en brotes provenientes de la parte basal. La capacidad de enraizamiento disminuyó a medida que aumentaba el período de aplicación de NPA, alcanzando una inhibición del 50% con respecto al control después de 5 días de tratamiento con NPA; adicional a lo anterior se presentaba retraso de 1 a 3 días en el proceso de enraizamiento. Por lo anterior, este compuesto no debe ser colocado al medio de enraizamiento GD de robles, en periodos de tiempo relativamente largos.

En micropropagación de brotes procedentes de yemas de dos meses de edad correspondientes al roble Colombiano *Q. humboldtii* Millán Orozco, (2006) utilizó el medio GD adicionado con BA mg/L⁻¹ durante el establecimiento y las primeras dos transferencias. Dentro de los resultados obtenidos, las concentraciones de 0.1 y 0.2 mg/L de BAP generó una producción significativa de brotes. En la fase de enraizamiento, La adición de 25 mg/L de AIB generó un incremento significativo en el porcentaje de este. No obstante, en esta especie, se reportaron dificultades en el enraizamiento por la alta producción de citoquininas endógenas en sus brotes. Aunque se reporta aparición de raíces durante la fase de multiplicación en presencia de BAP.

En la micropropagación de importantes especies de roble de Norteamérica *Quercus alba*, *Quercus bicolor* y *Quercus rubra*. Vieitez et al (2009) obtuvieron alta proliferación de brotes de explantes horizontales con el medio GD + BAP (0.88-0.44 μM) + Zeatina (2.28 μM) específicamente en las especies *Q. alba* y *Q. bicolor*. En lo que respecta a la etapa de enraizamiento, se obtuvo alta frecuencia en estas mismas especies cuando se utilizó ½ GD + AIB (122.5 μM) + Carbón activado (0.4%) por 48 horas.

Se han realizado ensayos sobre medios de cultivo de ejes embrionarios inmaduros con desarrollo cotidelnar temprano, medio, tardío y ejes embrionarios maduros para obtención directa de plantas en el roble Colombiano *Q. humboldtii* el cual fue publicado por Constanza *et al.*, (2005). En este ensayo se evaluaron las combinaciones de macroelementos de los medios Heller, QL, Durzan y MS (Apéndice E). Como resultados se concluye que el desarrollo y crecimiento de plántulas a partir de ejes embrionarios inmaduros no está específicamente determinado por los medios de cultivo, suplementos ni reguladores de crecimiento ensayados sino por el grado de desarrollo cotidelnar de la semilla tomada como explante; en este caso, los macroelementos QL facilitaron el desarrollo de un mayor número de plántulas, pero con hojas deformes, cloróticas y tallos delgados. Se resalta que los ejes embrionarios inmaduros en etapa de desarrollo cotidelnar tardío, en el medio WPM desarrollaron plántulas con apariencia normal. En el caso de los ejes embrionarios maduros, el carbón activado estimula la germinación de estos para la obtención directa de plántulas viables, aunque se afecta la viabilidad del sistema radicular. El medio WPM suplementado con AG_3 + Carbón activado, ambos con concentración de 0.5 mg/L^{-1} permitió con mayor frecuencia, la respuesta morfogénica anteriormente mencionada. (Ver Tabla 2)

La adición de Tiosulfato de plata (STS “Silver Tiosulfate) es una de las más recientes innovaciones en materia de micropropagación en roble. En cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, la incorporación de STS al medio de cultivo resulta efectivo en la disminución de síntomas de estrés probablemente causados por la acumulación de etileno en el frasco de cultivo (Cuba-Díaz *et al.*, 2014). En un estudio reciente publicado por

Winkeljohn *et al.*, (2022) reportaron un incremento en la tasa de supervivencia de brotes juveniles de menos de 1 cm sin hojas expandidas o endurecidas. Dicho incremento fue desde el 65% hasta el 73%. cuando se adiciono STS al medio de cultivo. En el diseño experimental, el medio control utilizado fue una mezcla de medio WPM y MS en una solución de 15 mL suplementado con 0.2 mg/L⁻¹ de BAP, 3% de sacarosa y 0.25% de agente gelificante llamado Goma gellan.. Para evaluar el efecto del STS se comparó con tubos con este mismo medio a los cuales se les adicionó 50 µM de STS. La investigación fue realizada en robles de Norteamérica (*Q. alba*, *Q. bicolor*, *Q. macrocarpa*, *Q. muehlenbergii* y *Q. palustris*).

En Tabla 2 se resume algunos medios de cultivo reportados en publicaciones científicas durante las últimas dos décadas con sus respectivos resultados en cuanto a regeneración *in vitro* de tejidos en diferentes especies del género *Quercus*

Condiciones Ambientales de Incubación

En robles del himalaya *Q. leucotrichophora* y *Q. glauca* Purohit, *et al.*, (2002) establecen una temperatura de incubación de 25 +/- 1° C con un fotoperíodo que consta de un ciclo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad con un valor de irradiancia de 42 µmol m⁻²s⁻¹ proporcionada por tubos de luz fluorescentes de 40 W en etapas de multiplicación de brotes y enraizamiento a partir de nodos cotidelonares previamente germinados Así mismo, los subcultivos fueron llevados a cabo en intervalos de 5 a 6 semanas.

Tabla 2

Medios de Cultivo y Composición Nutricional en Cultivo in vitro de Tejidos en Diferentes Especies de Roble.

Genotipos	Medio Basal	Compuestos Orgánicos	Orgánicos Composición No Definida	Tipo de Agar	Uso	Autor
<i>Quercus leucotrichophora</i> "Roble banjh del Himalaya	1. Medio WPM	1. Sacarosa al 3% (w/p) +BAP (22.19 μ M) + AG ₃ (2.89 μ M) + AIB (1,89 μ M).		Agar al 0.8% w/v	1. Etapa de clonación de brotes a partir de nodos cotiledonares previamente geminados a partir de embriones intactos. 2. Rizogénesis de brotes obtenidos en etapa de clonación.	(Purohit, et al., 2002)
<i>Quercus glauca</i> Roble azul Japonés	2. ½ WPM	2. Tratamiento previo con AIB por 24h de 100 μ M antes de transferir a ½ WPM sin reguladores de crecimiento.				
Clone Sainza de <i>Quercus rubur L</i> "Roble común Europeo" de 300 años.	1. Medio GD	1. 30 g/L ⁻¹ de sacarosa + 0.44 μ M de BAP		5.5 g/ L ⁻¹ de agar	1. Multiplicación de brotes clonados a través de diferentes subcultivos. 2. Etapa de enraizamiento	(Vidal et al., 2003)
Clone NL100 de <i>Quercus rubur L</i> "Roble común Europeo" de 100 años.	2. 1/3 de Medio GD	2. 0.12 mM de AIB.				
<i>Quercus humboltii</i> Roble Colombiano.	1. Medio GD	1. Entre 0.1 a 0.2 mg/L de BAP.			1. Etapa de multiplicación y subcultivos de brotes. 2. Inducción de enraizamiento.	(Millán Orozco, 2006)
	2. 1/3 de Medio GD	2.25 mg/L ⁻¹ de AIB				
<i>Quercus humboltii</i> Roble Colombiano	1. Medio MS	Opción 1.A TDZ 0.01 mg/ L	Mezcla de 1A/ 2B y Caseína Hidrolizada 500 mg/ L	Agar 6.5 g/ L ⁻¹	1. Etapa de estimulación y expresión para inducir respuesta morfogénica a partir de embriones cotiledonares inmaduros.	(Constanza et al., 2005)
	2. Medio MS	Opción 1B 2.0 mg/L ⁻¹ AIA + 0.2 mg/L ⁻¹ KIN + 0.1 mg/L ⁻¹				
	3. Medio WPM	Opción 2A 1.0 mg/L ⁻¹ AIB + 0.2 mg/L ⁻¹ KIN + 0.005 mg/L ⁻¹ TDZ			2. Respuesta embriogénica avanzada en etapa de estimulación - expresión a partir de embriones	
	4. Medio	Opción 2B				

	QL o WPM	0.005 mg/L ⁻¹ TDZ.			cotiledonares inmaduros.	
	5. Medio WPM	3. 1.0 mg/L ⁻¹ AIB + 0.2 mg/L ⁻¹ KIN + 0.005 mg/L ⁻¹ TDZ			3. Etapa de subcultivo en la inducción de respuesta morfológica a partir de embriones cotiledonares inmaduros.	
		4. Sin Reguladores de crecimiento.			4. Cultivo de ejes embrionarios zigóticos inmaduros en etapa de desarrollo cotiledonar medio o tardío para obtención directa de plántulas.	
		5. AG ₃ + Carbón activado (0.5 mg/l ⁻¹)			5. Cultivo de ejes embrionarios zigóticos maduros para obtención directa de plántulas.	
<i>Quercus euboica</i> Roble de troya o de Macedonia.	1. Medio WPM	1. Sacarosa 3% (w/v) + 100 mg/L de Mioinositol + 1 mg/L Tiamina + 0.5 mg/L piridoxina + 0.5 mg de ácido Nicotínico + 4.44 μM de BAP	0.8% (w/v)		1. Formación y propagación de brotes a partir de explantes nodales obtenidos de plántulas.	(Kartsonas & Papafotiou, 2007)
	2. Medio WPM	2. Sacarosa 3% (w/v) + 100 mg/L de Mioinositol + 1 mg/L Tiamina + 0.5 mg/L piridoxina + 0.5 mg de ácido Nicotínico + 9.84 μM de AIB.			2. Medio de enraizamiento durante 8 días en frascos cubiertos. Subcultivo en medio WPM después de 8 días libre de reguladores de crecimiento.	
<i>Quercus rubra L</i> Roble común	1. Medio WPM	1. 3% (w/v) de sacarosa	2.500 mg/L ⁻¹ de Caseína Hidrolizada.	0.24% (w/v) Phytigel	1. Germinación de embriones en explantes nodales.	(Vengadesan & Pijut, 2009)
	2. Medio WPM	2. 4.4 μM de BAP + 0.29 μM de Ácido Giberélico (GA3) + 3% (w/v) de sacarosa.			2. Clonación <i>in vitro</i> a partir de explantes nodales.	
	3. Medio WPM	3. 4.9 μM de AIB			3. Rizogénesis por 5 días en oscuridad e incubación a 26° C seguido de transferencia en	

				Medio WPM libre de reguladores de crecimiento y fotoperiodo de 16 horas	
<i>Quercus rubra L</i> Roble común	1. Medio WPM	1. BAP (0.88-0.44 μ M) + AgNO ₃ (3mg/L) +30 g/L ⁻¹ de Sacarosa	6.5 g/L ⁻¹ de Vitroagar	1. Aumento de brotes primordiales y segmentos nodales aislados de brotes epicormicos de árboles de 7 años.	(Vieitez et al., 2009)
	2. ½ WPM	2. AIB (122.5 μ M)			
<i>Quercus alba</i> Roble blanco	1. Medio GD	1. BAP (0.88-0.44 μ M) + Zeatina (2.28 μ M).	6.5 g/L ⁻¹ de Vitroagar	1. Aumento de brotes primordiales y segmentos nodales aislados de brotes epicormicos de árboles de 7 años.	(Vieitez et al., 2009)
	2. ½ GD	2. AIB (122.5 μ M)			
<i>Quercus bicolor</i> Roble Bicolor	1. Medio GD	1. BAP (0.88-0.44 μ M) + Zeatina (2.28 μ M).	6.5 g/L ⁻¹ de Vitroagar	1. Aumento de brotes primordiales y segmentos nodales aislados de brotes epicormicos de árboles de 7 años.	(Vieitez et al., 2009)
	2. ½ GD	2. AIB (122.5 μ M)			
<i>Quercus castanea</i>	1. Medio MS	1.3.0 mg/L ⁻¹ de BAP + 3% (w/v) de Sacarosa.	1. 0.8% (w/v) de agar	1. 97 % de inducción y multiplicación de	(Delgadillo-Díaz, et al., 2013)
	2. ½ MS				

Encino capulincillo de México		2.10 mg/L-1 AIA + 3% (w/v) de Sacarosa		2. 0.25% (w/v) Phytigel	brotos a partir de embriones zigóticos 2. 100% de enraizamiento en 5 días.	
<i>Quercus eduardii</i>	1. Medio MS	1. 4.0 mg/L ⁻¹ de BAP + 3% (w/v) de Sacarosa.		1. 0.8% (w/v) de agar	1. 91.7% de inducción y multiplicación de brotes a partir de embriones zigóticos.	(Delgadillo-Díaz, <i>et al.</i> , 2013)
Encino manzano de México	2. ½ Medio MS	2. 10 mg/L-1 AIA + 3% (w/v) de Sacarosa		2. 0.25% (w/v) Phytigel	2. 100% de enraizamiento en 5 días.	
<i>Quercus resinosa</i>	1. Medio MS	1. 3.0 mg/L de BAP + 3% (w/v) de Sacarosa.		1. 0.8% (w/v) de agar	1. 75% de inducción y multiplicación de brotes a partir de embriones zigóticos.	(Delgadillo-Díaz, <i>et al.</i> , 2013)
Encino amarillo de México	2. ½ Medio MS	2. 10 mg/L-1 AIA + 3% (w/v) de Sacarosa		2. 0.25% (w/v) Phytigel	2. 66.7% de enraizamiento en 5 días.	
<i>Quercus rugosa</i>	1. Medio MS	1. 1.0 mg/L de BAP + 3% (w/v) de Sacarosa.		1. 0.8% (w/v) de agar	1.83.3% de inducción y multiplicación de brotes a partir de embriones zigóticos.	(Delgadillo-Díaz, <i>et al.</i> , 2013)
Encino quiebra hacha de México	2. ½ MS	2. 10 mg/L-1 AIA		2. 0.25% (w/v) Phytigel	87.5% de enraizamiento en 5 días.	
<i>Quercus ilex</i>	Medio MS	30 g/L ⁻¹ de Sacarosa + 0.02 g/L ⁻¹ de ácido ascórbico	10 g/L-1 de Carbón activado	6 g/L ¹ de agar.	Alta frecuencia en la inducción de embriogénesis somática en óvulos aislados de integumentos de tejidos de flores femeninas de árboles maduros.	(Barra-Jiménez <i>et al.</i> , 2014)
Encina o chaparro						
<i>Quercus aegilops</i> <i>L</i>	1. Medio WPM				1. 100% de germinación de embriones con periodo de estratificación a 4° C por dos semanas.	(Fadldeen & Toma, 2020)
	2. Medio WPM	1. 0.5 mg/L ⁻¹ de AG ₃				
	3. Medio WPM	2. 3.0 mg/L ⁻¹ de BAP			2. Etapa de inducción y multiplicación de brotes a partir de embriones germinados	
		3. 1.0 mg/ L-1 de ANA			3. Etapa de enraizamiento.	

Robles de Norteamérica	1. Medio WPM	1. Vitaminas del medio MS + 0.2 mg/L ⁻¹ BAP + 3% Sacarosa	50 µM de STS 24 a 48 horas después de cultivar los brotes.	Goma Gellan 0.25%	La tasa de supervivencia de los brotes cultivados en medio con STS (Tiosulfato de Plata o silver Tiosulfate) se incrementó de 65% a 73%	(Winkeljohn et al., 2022)
<i>Quercus alba</i>						
<i>Q. bicolor</i>						
<i>Q. macrocarpa</i>						
<i>Q. muehlenbergii</i>						
<i>Quercus palustris</i>						

En el roble Colombiano *Q. humboldtii*, las yemas apicales y nudos de plántulas de dos meses de edad se mantuvieron durante el establecimiento y multiplicación *in vitro* en cámara de crecimiento a 25° C durante 16 horas de luz y 20° C durante ocho horas de oscuridad con una intensidad luminosa de 30 µmol m⁻²s⁻¹ (Millán Orozco, 2006). En esta misma especie, Constanza *et al.*, (2005) utilizó condiciones de incubación con temperatura de 23 +/- 2 °C en oscuridad durante la etapa de estimulación expresión y con fotoperiodo de 16 horas durante el subcultivo. Estas condiciones fueron dadas para la proliferación *in vitro* de ejes embrionarios cigóticos maduros e inmaduros.

En el roble de troya o de Macedonia *Q. euboica*, durante la etapa de multiplicación de brotes, los explantes nodales fueron incubados a 25° C en fotoperiodo de 16 horas a 37.5 µmol m²s⁻¹ usando una lámpara fluorescente de luz blanca fría (Kartsonas & Papafotiou, 2007). En el roble rojo de Norteamérica, (Vengadesan & Pijut, 2009) reportan que las condiciones de incubación para el enraizamiento consistían en incubación en oscuridad a 26 °C por 5 días. Posterior a ello, se les aplicaba fotoperiodos de 16 horas a 25 +/- 2° C provistos por lámparas fluorescentes de luz blanca fría en una intensidad de 50 µmol m⁻²s⁻¹. En etapa de proliferación de brotes en esta misma especie, (Vieitez *et al.*, 2009) reporta condiciones de incubación las cuales consisten en cámaras de crecimiento con fotoperiodos de 16 h usando una intensidad luminosa entre los 50-60 µmol m⁻² s⁻¹ provistos de una

lampara de luz blanca fluorescente y temperatura de 25° C en las horas de luz y de 20° C en oscuridad.

En los robles de México Delgadillo-Díaz, (2013) utilizaron en etapa de inducción y multiplicación de brotes periodos iniciales de dos semanas bajo condiciones de oscuridad. Posterior a ello, transferencia a condiciones de incubación con luz por ocho semanas usando lamparas fluorescentes de intensidad luminica de $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 25 ° C +/- 2° C.

Las condiciones de crecimiento utilizadas en ensayos para evaluar el efecto del STS (Tiosulfato de Plata) en la tasa de supervivencia de brotes juveniles inducidos de especies de roble de Norteamérica los cuales tenían como características que poseían 1 cm, sin hojas expandidas o endurecidas fueron propuestas por En dichas condiciones, los brotes se incubaron en cuartos con baja intensidad lumínica ($10\text{--}20 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$) la cual es considerada como “radiación fotosinteticamente activa” con un fotoperíodo de 16 h a 25 °C Winkeljohn et al (2022).

Adaptación o Aclimatación de las Vitroplantas a Condiciones *ex vitro*

El periodo de aclimatación de las plantas regeneradas *in vitro* debe considerar los siguientes parámetros: (1) Tipo de Sustrato (2) Humedad ambiental relativa del invernadero (3) temperatura y (4) luminosidad. Con respecto al sustrato, es fundamental controlar la humedad para evitar deshidratación de las plántulas. Así mismo, se recomienda el uso de vermiculita, turba, suelo-arena o suelo previamente esterilizado. Se debe mantener una alta humedad relativa puesto que las vitroplantas se caracterizan por no poseer una cutícula y estomas poco desarrollados. Finalmente, en lo que respecta a la temperatura y la

luminosidad se recomienda colocar las plántulas recién trasplantadas en un sitio de baja luminosidad y progresivamente ir las exponiendo a la luz (Ramirez, Guevara, & Escobar, 2012).

En un estudio sobre la multiplicación *in vitro* de robles del Himalaya propuesto por Purohit, (2002) se evaluó el efecto de diferentes temperaturas e intensidades lumínicas en variables como tasa de fotosíntesis y de transpiración tanto en plantulas *ex vitro* como aquellas obtenidas por propagación *in vitro* de una segunda cosecha de yemas de *Q. leucotrichophora*. Como resultado, la fotosíntesis se incrementó con una intensidad de luz de $2000 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$ tanto en plántulas obtenidas *in vitro* como aquellas en condiciones *ex vitro* siendo la temperatura óptima para la fotosíntesis de 25°C . De igual manera se observó que una alta intensidad de luz junto con altas temperaturas afectan de forma adversa el intercambio de dióxido de carbono. Entre tanto, la tasa de transpiración se incrementó cuando se alcanzó una temperatura de 35°C sin considerar la intensidad lumínica tanto en plantas *ex vitro* como *in vitro*. No obstante, el descenso neto de la tasa de transpiración fue observada cuando la temperatura se incremento a 40°C . Específicamente en *Quercus glauca* la temperatura óptima para la fotosíntesis fue de 30°C con una intensidad lumínica de $1500 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$ tanto en plantulas *ex vitro* como obtenidas de forma *in vitro*. Así mismo, la máxima tasa de transpiración en *Q. glauca* se obtuvo a 35°C e intensidad lumínica $1500 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$.

El sustrato es un factor importante en la aclimatación en condiciones *ex vitro*. Por ejemplo, en la aclimatación de *Q. euboica* (Roble de Macedonia), el uso de sustrato del hábitat natural de dicha especie generó un alto porcentaje de supervivencia (Entre 79 a

93%) en comparación al sustrato con mezcla de compost- Vermiculita (Entre 21 -36%). Así mismo se evidenció un crecimiento mas vigoroso en las plantulas aclimatadas. La razón que se debe del alto porcentaje de supervivencia es porque en el suelo del habitat de *Q. euboica* K hay una diversidad considerable de micorrizas que aportan nutrientes esenciales para el desarrollo de *Q. euboica*. (Vengadesan & Pijut, 2009).

El protocolo de tranferencia de suelo para el caso de los encinos mexicanos es descrito por Delgadillo-Díaz, *et al* (2013). Este consiste en remover las plantas del medio de enraizamiento, lavando las raices delicadamente con agua de grifo con el fin de remover los residuos del medio de cultivo. Dichas vitroplantas se transfieren a semilleros con una mezcla (1:1) de arena y turba. Dicho semillero debe ser cubierto con un plástico para mantener una alta humedad. Las plantas conservadas son almacenadas por un mes en cámara bioclimática bajo un fotoperíodo de 16 horas de luz con una intensidad luminica de $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $25 \pm 2^\circ \text{C}$. La aclimatación de las plántulas se hace de forma gradual a condiciones de temperatura y humedad ambiente removiendo progresivamente el plástico que cubre los semilleros. Este proceso de aclimatación dura 4 semanas hasta que finalmente se transfieren a invernadero con las mismas condiciones de sustrato anteriormente descritas.

En la micropropagación *in vitro* de embriones obtenidos del roble de medio oriente *Q. aegilops*, el protocolo de aclimatación propuesto por Fadladeen & Toma, (2020) consistió en tomar las plántulas obtenidas del medio de enraizamiento, lavarlas con agua para remover los restos de medio adherido. Luego de ello, sumergir dichas plántulas en una solución de 1.8 mg/L de fungicida beltanol por 10 minutos seguido de un lavado con agua

destilada, después de los pasos anteriores, las plántulas enraizadas se transfieren a macetas con un sustrato previamente autoclavado de turba, marga y espuma de poliestireno en una proporción (1:1:0.5) (v:v:v). Finalmente, las macetas son colocadas bajo una caja esterilizada cubierta con poliestireno durante la primera semana siendo estas exfoliadas con un cuarto de sales de Medio WPM. En la segunda semana dicho plástico es retira

Bancos de Germoplasma a Partir del Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales

La crio biotecnología es una herramienta de gran valor en el establecimiento de estrategias de conservación *ex situ* de especies forestales o vegetales que son objeto de conservación bien sea por ser especies en peligro de extinción o porque son especies que tienen un papel ecológico clave dentro de la dinámica de un ecosistema. Una de las estrategias que relaciona la micropropagación *in vitro* dentro del marco de la crio biotecnología es la conservación de germoplasma mediante el cultivo de tejidos. Esta se logra generalmente con el empleo de temperaturas de incubación y de medios de cultivo subóptimos o bien sea por la utilización de la denominada crioconservación a temperaturas ultra bajas (-196 °C) con nitrógeno líquido que causa el cese de todas las reacciones metabólicas celulares.

También se reporta el uso de la desecación parcial, almacenaje a baja presión y niveles de oxígeno (Mroginski & Roca, 1991). Esta última técnica se basa en el análisis de contenido de agua del tejido (WC por sus siglas en inglés). Dicho método analítico para evaluar viabilidad después de la crio preservación fue propuesto por Verleysen *et al.*, (2004). Este método consiste en un modelo matemático que relaciona el “contenido de agua” con el peso del material vegetal encapsulado.

Las técnicas analíticas consisten en pruebas de fuga de electrolitos y la tinción con TCC (Cloruro de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolio). La primera técnica se usa normalmente en silvicultura para medir daño por congelación o la pérdida de contenido de agua WC (Water content) después de la cosecha. La fuga de electrolitos según Ögren (1997) indica la concentración intercelular de carbohidratos en función del descenso de la temperatura

teniendo en cuenta que la concentración de estos actúa como crioprotector de las células. Por otra parte, la tinción con TCC es una técnica que normalmente está enfocada en probar la viabilidad de las semillas o polen, aunque normalmente se utiliza para probar la actividad bioquímica de los tejidos de las plantas después de algún tratamiento en frío. Es un método de referencia utilizado por la organización internacional de pruebas de semillas (ISTA). La prueba esencialmente se basa en que las células vivas se indican con una coloración rojiza. Esta coloración es un indicador positivo de actividad redox propia de tejidos con respiración celular activa. Esto se debe a que el Cloruro de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolio es reducido enzimáticamente a 1,3,5-trifenilformazán por acción de las enzimas deshidrogenasas presentes en el ciclo de Krebs Verleysen *et al.*, (2004). Los pasos más comunes para crio preservación a largo plazo o los denominados “Bancos genéticos básicos de acuerdo con Mroginski,(1993); Pedroza, J (2008) son: Pretratamiento, crio protección, congelamiento lento, almacenaje, descongelamiento, pruebas de Viabilidad y recultivo. A continuación, se especifica las técnicas que están implicadas en los pasos anteriores de acuerdo con los autores mencionados:

Pretratamiento o precultivo: Para minimizar los daños generados por los cristales de hielo suele requerirse tasas de crecimiento elevada las cuales produzcan células que tengan vacuolas pequeñas.

Crioprotección: Se pueden utilizar distintos compuestos químicos como glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), prolina, manitol o sorbitol, sacarosa, glucosa, y polietilenglicol. Dichos compuestos protegen frente a roturas por el hielo y pueden descender la temperatura de congelación inicial y alterar las formas de los cristales de hielo. Hay que

tener presente la concentración de estas sustancias puesto que una alta concentración de estas puede generar efectos citotóxicos en el medio de cultivo.

Crecimiento lento: El enfriamiento lento produce en primer lugar, congelación extracelular. La disminución de la temperatura oscila entre 0.1 y 3° C por minuto hasta que alcance una temperatura de terminada, usualmente -40° C punto en el que parte del agua ha sido congelada extracelularmente, luego se coloca directamente en nitrógeno líquido.

Almacenamiento: Almacenar en nitrógeno líquido (-196 °C) o en su vapor (-150 °C) posibilita el cese de prácticamente toda actividad metabólica. Almacenamiento por encima de los -100° C producirá cambios en los cristales de hielo por lo que habrá que evitar temperaturas superiores a este valor.

Descongelamiento: Este tiene que hacerse rápido para evitar la formación de cristales de hielo para evitar daños provocados por el crecimiento de cristales de hielo si el descongelamiento fuera lento. Las técnicas más usadas consisten en introducción en agua, incubación a 40° C, material contenido en ampollitas a la temperatura del laboratorio o exposición a corrientes de aire caliente.

Recuperación: Es necesario volver a criar las células recién descongeladas con el fin de que tengan un crecimiento normal. Es necesario evitar la producción de callos. La regeneración reproducible de plantas enteras es una de las problemáticas más relevantes dentro del proceso de crio preservación.

Pruebas de viabilidad: En condiciones de crecimiento lento, la frecuencia de evaluación de los cultivos aumenta en comparación con la evaluación que se haría al material conservado bajo nitrógeno líquido. Las pruebas de viabilidad se pueden hacer de

diferentes maneras según el tipo de explante utilizado. En el caso de los meristemos, estos se recultivan y se evalúa su capacidad de regenerar plántulas. En el caso de células y protoplastos se utiliza la coloración de diacetato de fluoresceína (FDA). Las células vivas adquieren coloración y emiten fluorescencia en presencia de luz ultravioleta.

Pruebas de estabilidad genética: Cualquier sistema de cultivo *in vitro* será inaceptable si introduce un alto riesgo de inestabilidad genética o de selección de genotipos o de ambas cosas. Se utilizan técnicas de marcadores moleculares basados en secuencias simples repetidas (SSR) para identificar genotipos en la conservación y manejo de germoplasma. Como complemento de la evaluación de estabilidad se deben desarrollar técnicas electroforéticas con el fin de evaluar la variabilidad de las isoenzimas en muestras pequeñas de tejidos obtenidos en cultivo *in vitro*. Para monitorear la estabilidad genética, se pueden utilizar técnicas moleculares como lo es, por ejemplo, la variación del polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción de ADN (RFLPs).

Recultivo: Una vez descongelado el material vegetal, debe ser recultivado. Se utilizan en general, los mismos medios y condiciones en que crecía antes de su congelamiento.

De acuerdo con (Ballesteros & Pritchard, 2020), en roble, la tecnología de la embriogénesis somática y la micropropagación *in vitro* de ápices caulinares se han reportado disponibles para 39 especies de roble siendo la crio preservación de embriones somáticos rutinariamente mostrada en tres especies comerciales y la crio preservación de ápices caulinares exitosamente lograda en dos especies comerciales más. Los ejes embrionarios de semillas son los explantes preferidos para la conservación *ex situ* de roble

con reportes de supervivencia y regeneración de plantas reportada para 14 y 7 especies de roble, respectivamente. Finalmente, la preservación de yemas dormantes es una técnica de crio preservación promisorias, aunque ha sido poco investigada en el roble. En lo referente al mantenimiento de germoplasma *in vitro* de individuos del género *Quercus* a corto y mediano plazo, se ha preservado embriones somáticos obtenidos por embriogénesis secundaria con subcultivos que oscilan en periodos de mantenimiento de 4 años. En referencia a las metodologías de mantenimiento de germoplasma a largo plazo, presenta una desventaja y es la limitada representación genética *in vitro* debido a que se pueden mantener pocos individuos. En la preservación a largo plazo con mejor representación genética en el género *Quercus* se ha preferido conservar propágulos o partes de este a través de la crio preservación.

Criobiología de Germoplasma a partir de Callos Embriogénicos y Embriones Somáticos

Pretratamiento

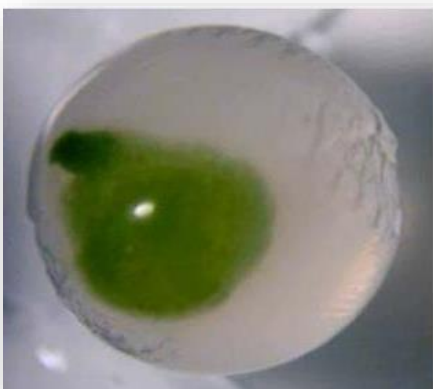
La crio preservación de embriones somáticos en las especies *Q. robur* y *Q. suber* es reportada por Martínez et al.,(2003) y Fernández et al., (2008). En la investigación del primer autor se reporta que se desarrolla un protocolo de criopreservación en *Q. robur* con el fin de limitar los riesgos de variación soma clonal y contaminación. En el desarrollo de dicho protocolo, se investigó sobre los pre-tratamientos que permitieran la resistencia de los embriones en etapa de corazón globular a la ultracongelación con nitrógeno líquido. Como resultado, la embriogénesis se reanudó en un 70% después de la congelación, cuando el pretratamiento consistió en precultivos sucesivos en medios suplementados con sacarosa

en concentraciones de 0.3 y 0.7 M seguido de desecación con aire de cabina de flujo laminar con un contenido de agua entre el 24 y 34%. Así mismo, la aplicación de una de vitrificación (PVS2) durante 60 a 90 minutos permitió esta efectividad de supervivencia post ultracongelación en nitrógeno líquido.

Finalmente, en el pretratamiento publicado por Fernández *et al.*, (2008) se describe el uso de una metodología de encapsulación y deshidratación con un resultado de supervivencia de embriones somáticos cercanos al 90%. La encapsulación de cada grupo de embriones somáticos se realizó en capsulas de alginato, seguido de incubación por tres en 0.7 M de sacarosa y una subsecuente desecación del 25 a 35% del contenido de agua (Método WC Water Content) previo a la congelación con nitrógeno líquido. Dichas capsulas contienen una solución de 0.1 M de CaCl_2 y 3% (w/v) de solución de alginato preparado en medio MS adicionado con 0.5 de Sacarosa (Figura 2).

Figura 2

Modelo de Embrión en Estadio de Plúmula de la Especie Laelia anceps ssp



.Nota. Tomada de Lee-Espinosa, et al (2009)

Se han conservado líneas embriogénicas establecidas a partir de tejidos maduros y arboles maduros de *Quercus ilex* y *Quercus suber*, respectivamente. A partir de muestras de tejidos maduros de *Q.ilex*, Barra-Jiménez et al., (2015) obtuvieron grupos embriogénicos globulares de tres líneas cultivadas. Dos de estas fueron obtenidas de medios gelificados y una de medio líquido. En el ensayo se evaluó el efecto tanto del precultivo con alto contenido de sacarosa como la deshidratación por incubación en la solución de vitrificación (PVS2) de 30 a 90 minutos en la supervivencia, capacidad de diferenciación con o sin inmersión en nitrógeno líquido. Como resultado, se obtuvo, que la capacidad de diferenciar embriones cotiledonarios dependía en gran medida del genotipo. Así mismo, las altas frecuencias de recuperación de crecimiento se obtuvieron en medio gelificado y aumento de peso fresco en medio líquido.

La capacidad de diferenciación de las líneas embriogénicas se vio seriamente afectada por la inmersión en el nitrógeno líquido, especialmente en una de las dos líneas obtenidas en medio gelificado. Los mejores resultados se obtuvieron en el genotipo Q8. El 80% de los explantes cultivados en medio gelificado, se diferenciaron en embriones cotiledonares después de la crio preservación cuando el precultivo se realizó en un medio con sacarosa 0.3 M seguida de una incubación durante 30 minutos en solución PVS2. Los explantes del mismo genotipo en medio líquido no pudieron recuperar la capacidad de diferenciación. En tejidos maduros de *Quercus suber*, Valladares, S. et al (2004) publicó un estudio sobre el efecto del procedimiento de vitrificación simple para la crio preservación exitosa de líneas embriogénicas de alcornoque. Como resultado, se obtuvieron altos niveles de recuperación de embriones (88-93 %) precultivando primero grupos de 2-4

mg de dos o tres embriones globulares en medio semisólido que contenía sacarosa de concentración 0,3 M durante tres días, seguido de incubación en solución de vitrificación PVS2 a 0 °C durante 60 min antes de la inmersión directa en nitrógeno líquido. El número medio de embriones producidos por explante fue significativamente mayor para los embriones crio almacenados con dicho tratamiento.

La construcción de bancos de germoplasma a partir del enfoque anterior ha sido desarrollada a nivel de laboratorio desde hace más de una década. Según Vieitez *et al.*, (2012), se han propuesto desde esta época la creación de criobancos de genotipos de alcornoque *Quercus Suber* con base a la proliferación exitosa de 51 líneas embriogénicas después de la inmersión en nitrógeno líquido. Dichos estudios pioneros han sido base para el desarrollo de iniciativas de crioconservación a gran escala de especies leñosas amenazadas para las cuales ya se han desarrollado procedimientos de micropropagación previamente.

Criopreservación

Según Fernández *et al.* (2008), los embriones somáticos de alcornoque *Q. suber* encapsulados en capsulas de alginato son crio conservados en criotubos (10 por vial) para luego ser congelados en nitrógeno líquido por inmersión directa y almacenados por 24 horas. Posteriormente son descongelados en inmersión en baño de agua (38° C por 2 minutos hasta que los cristales de hielo no son visibles. La rehidratación de las capsulas de alginato se realiza en una solución de 1.0 M de sacarosa en medio líquido MS por 1 hora seguido por un cultivo en medio sólido MS.

Pruebas de Viabilidad y Estabilidad Genética

Con el fin de evaluar variación soma clonal en embriones somáticos crio preservados en *Q. suber*, Fernández et al. (2008) realizaron un análisis de ploidía del ADN usando la técnica de citometría de flujo tomando como control grupos de embriones somáticos encapsulados en las capsulas de alginato sometidos a deshidratación más no congelados; en comparación con material crio preservado. Como resultado no hubo diferencia significativa. De igual manera, se evaluó estabilidad genética usando marcadores moleculares AFLPs y SSR. Los primeros marcadores son basados en amplificación por PCR, los cuales permiten detectar un gran número de loci y, por ende, un amplio espectro de polimorfismos.

Entre tanto, los marcadores SSR por sus siglas *Simple Sequence Repeats* identifican microsatélites o las denominadas regiones TANDEM en el genoma. Como resultado, el análisis de estabilidad genética usando ambos marcadores, no reveló diferencias significativas entre el control y las muestras crio preservadas. Sin embargo, se encontraron polimorfismos entre el material control y las muestras deshidratadas al 25%. Es decir, el método WC (Water content) se recomienda con un porcentaje de deshidratación del 35%. Este estudio esencialmente concluyó que el método de encapsulación-deshidratación es viable para crio preservación a largo plazo.

Criobioteología a Partir de Brotes Apicales Propagados

Los brotes apicales cultivados en condiciones *in vitro* son una fuente común de material vegetal para la crioconservación de especies vegetales de interés para la

agricultura, silvicultura y la conservación de especies amenazadas (Ballesteros & Pritchard, 2020).

Pretratamiento

El uso de brotes apicales en crio preservación es reportado en diferentes especies de roble de Norteamérica. (*Quercus virginiana*, *Q. hinckleyi*, *Q. suber* y *Q. gambelii*). En una investigación realizada por Pence & Chaiken, (2021) se tomaron brotes apicales de las especies anteriormente descritas las cuales fueron previamente mantenidos en condiciones *in vitro* entre 1 y 2 meses. Para crio preservación se tomaron ápices de cualquier brote que no presentara coloración parda. Los brotes aislados presentaban un tamaño de 1 a 2 mm y fueron aislados en Medio MS + Sacarosa 3%, 0.1 mg/L⁻¹ + manitol 0.3 M + ABA 10 μM + Gelzan al 0.25% en placas de polipropileno de 60 * 15 mm (Falcon™). La incubación de estos se realizó bajo tres condiciones ambientales distintas:

26° +- 2 °C con intensidad lumínica de 10-20 μmol m⁻² s⁻¹

21° C con intensidad lumínica de 15-20 μmol m⁻² s⁻¹

Condiciones de incubadora programable alternando a 27° C / 15° C y luz a 30 μmol m⁻²s⁻¹

En este caso todas las condiciones cumplían el mismo fotoperiodo (16 h luz/ 8h oscuridad). Finalmente, la técnica de precultivo se basó en el método droplet de vitrificación la cual consiste en incubar en grupos por 10 a 15 minutos en una solución de medio MS + 0.4 M de sacarosa + 2 M glicerol, luego, 20 minutos en solución PVS2 (Medio MS + 0.4 sacarosa + 30 % glicerol + 15% etilenglicol + 15% DMSO). Cada grupo de 10 brotes apicales es colocado en una tira estéril de papel aluminio de 0,8 x 3.0 cm con una

pequeña cantidad de PVS2 sumergida directamente en nitrógeno líquido. Cada lamina de estas se coloca en un criovial de polipropileno de 2 mL ultracongelado en nitrógeno líquido por una hora.

Almacenamiento, Descongelamiento y Recuperación

El protocolo descrito por Pence & Chaiken, (2021) consiste en que una vez realizada la crio preservación en Nitrógeno líquido las puntas de los brotes se trasladan a un medio de recuperación el cual cumple los requerimientos nutricionales del medio utilizado en el precultivo. Así mismo, se recuperan en las mismas condiciones de temperatura y luz que se usaron para el precultivo. Para controlar los efectos potenciales de PVS2 en la supervivencia, se agrupan 10 puntas de brotes para remover la solución de PVS2 haciendo un enjuague durante 10 min en una solución de medio MS + Sacarosa 1.2 M para finalmente ser movidos a un medio de recuperación.

Criobiología a Partir de Plúmulas Embrionarias

El estadio de plúmula se le conoce al meristemo apical de embriones. Según Ballesteros & Pritchard, (2020) es un enfoque promisorio dentro de la crio biotecnología del roble por dos razones: La primera es que las plúmulas tienen un gran valor potencial para el desarrollo de una plántula completa en condiciones *in vitro* y la segunda es que se podría almacenar una alta diversidad genética de una población debido que al extirpar las plúmulas de los embriones será similar a conservar la semilla entera o el eje del embrión.

Pretratamiento

La crio protección de las plúmulas en *Q. rubur* consiste inicialmente en almacenarlas por 18 horas en una solución de sacarosa 0.5 M posterior a las pruebas de

contenido de agua (WC). Posterior a ello, se someten a una solución de sacarosa 0.75 M por 40 minutos seguida de una inmersión en solución de sacarosa 1.0 M por 40 minutos y glicerol 1.5 M por 40 minutos. Posterior a ello, desecación en gel de sílice o nitrógeno gaseoso por 20 minutos debido a que en este tiempo no afecta el contenido de agua WC ni tampoco la supervivencia de las plúmulas mientras estas sean tratadas con sacarosa y glicerol según el protocolo anteriormente descrito. (Chmielarz et al., 2011).

Almacenamiento, Descongelamiento y Recuperación

Según el protocolo descrito por Chmielarz et al., (2011), las plúmulas se crioconservan de forma ultrarrápida con granizado de nitrógeno ultra líquido (Subenfriado a -210°C al vacío) o rápida (inmersión directa en Nitrógeno líquido en crio frascos de polipropileno). En pocas palabras, debe haber contacto directo con el nitrógeno líquido. En cuanto al descongelamiento, el protocolo consiste en una transferencia a una solución de sacarosa 1, 2 M a 42°C por 1 minuto, seguido de una transferencia en hielo para disminuir la temperatura de la solución de sacarosa durante 2 minutos. Finalmente, una rehidratación lenta colocando las plúmulas en una solución de sacarosa 0.5 M durante 40 minutos a 23°C . Es de aclarar que, en dicho ensayo, se evaluó el efecto de la procedencia de las plúmulas en el protocolo de criopreservación.

Para finalizar el protocolo, dichas plúmulas se secaron sobre gel de sílice durante 20 minutos y se sumergieron directamente en viales con nitrógeno líquido durante 24 horas para finalmente descongelar según el protocolo mencionado anteriormente. Como resultado al anterior protocolo, de crioconservación se reporta alto porcentaje de crio preservación (Rango entre 21-67% dependiendo del pretratamiento). La desecación en gel de sílice dió

lugar a una alta tasa de supervivencia posterior a la crio preservación (58%) en contraste al proceso hecho con nitrógeno gaseoso (29%) con un porcentaje de rebrote de hojas entre el 5 y 18%. Con respecto al secado, ambos métodos redujeron el contenido de agua entre 0.5 y 0.6 g de H₂O g⁻¹. Es importante aclarar que el tiempo de exposición al nitrógeno líquido no influyó significativamente en la supervivencia y rebrotes de las plúmulas posterior al crio almacenamiento. Finalmente, el efecto de la procedencia de las plúmulas no tuvo diferencia significativa. Se resalta tasas de supervivencia entre el 51-76% y porcentaje de rebrote de 8 al 20%.

Pruebas de Viabilidad

De acuerdo con el protocolo de Chmielarz et al., (2011), la supervivencia y el rebrote son los indicadores utilizados en la crio preservación de plúmulas. Después de dos semanas de realizar el recultivo *in vitro*, se evaluó supervivencia considerando coloración verde de las plúmulas e incremento de tamaño y en el rebrote se evalúa la aparición de brotes frondosos entre 3- 6 mm tras 8 semanas de propagación *in vitro* (Figura 3). Dicho parámetro se evaluó según el número de plúmulas cultivadas. Los resultados cuantitativos fueron descritos en el apartado anterior. El protocolo de recultivo y regeneración de las plántulas a partir de las plúmulas consistió en colocarlas inicialmente en una solución de 5% de hipoclorito sódico NaClO y 1% de hidróxido sódico NaOH durante 5 minutos seguido de un enjuague de cuatro veces en una solución estéril de sacarosa 0,5 M. L. Posterior a la desinfección, se cultivan en placas Petri de plástico estériles (55 mm) sobre un medio WPM con 0,8 mg/l de BAP + sacarosa (30 g/l) + agar (7,0 g/l). El pH se ajustó a 5,7 antes de esterilizar en autoclave. Las plúmulas se cultivaron bajo una intensidad

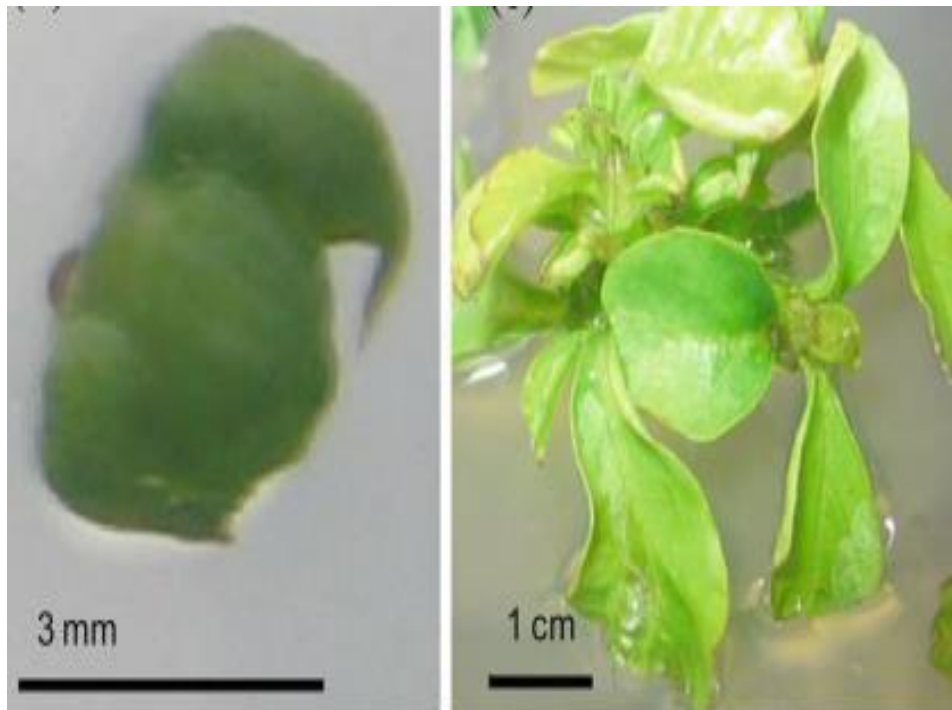
luminosa de $77 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 16 h/8 h de luz/oscuridad a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Los brotes con hojas pequeñas se subcultivaron cada 3-4 semanas. Se enraizaron brotes de hasta 2,5 cm de altura en recipientes Magenta, en medio 1/2 WPM que contenía 0,5 mg/l de IAA (ácido indol-3-acético), sacarosa (30 g/l) y solidificado con agar (7,0 g/l). Tras 5-6 meses de cultivo, las plántulas con raíces bien desarrolladas (5-10 cm) tenían unos 4-5 cm de altura, por lo que se transfirieron a macetas para su proceso de aclimatación.

Criopreservación de Yemas Dormantes en Especies de *Quercus* sp

La crio preservación de yemas latentes o dormantes es una técnica utilizada en especies leñosas especialmente de regiones templadas del mundo. Por tal razón no sería de gran utilidad en esta especie neotropical. De acuerdo con Ballesteros & Pritchard, 2020) dichas yemas latentes se cosechan en campo a mediados de invierno, se desecan hasta alcanzar un contenido de humedad del 25 a 41% dependiendo de la especie.

Figura 3

Crecimiento de Plúmulas Cultivadas de Q. rubur Después de la Crioconservación



Nota. Imagen Izquierda: Plúmula recuperada 2 meses después del periodo de crio preservación. Imagen Derecha: Brotes de tres meses de edad derivados de plúmulas recuperadas después de la crio preservación. (Chmielarz et al., 2011)

Suelen enfriarse en dos fases: Enfriamiento controlado y relativamente lento hasta -30 o 40° C hasta transferir a vapor de nitrógeno líquido. Dependiendo de la especie se usa o no crioprotectores. Dichas yemas se recuperan posteriormente mediante injerto directo en la yema del árbol, microinjerto de la punta disectada del brote o por micropropagación. Fundamentalmente la crioconservación de yemas vegetativas depende del nivel de resistencia al frío del material recolectado. En el caso puntual de las especies del género *Quercus sp* podría ser un enfoque promisorio en tanto que varias especies de este género

habitan ambientes fríos. La recuperación y crecimiento de explantes tras la crio preservación requiere como requisito protocolos adecuados de micropropagación de yemas latentes. Se han desarrollado protocolos de micropropagación de yemas latentes en diferentes especies de roble de zonas templadas como lo son: *Q. alba*, *Q. bicolor*, *Q. cerris*, *Q. falcata*, *Q. imbricaria*, *Q. macrocarpa*, *Q. pagoda*, *Q. palustris*, *Q. robur*, *Q. rubra*, *Q. texana*, *Q. variabilis* y *Q. virgiliana* (Brennan *et al.*, 2012).

Criopreservación de Embriones de Semilla

Los ejes embrionarios o embriones zigóticos (explantes con meristemas tanto de brotes como de raíces) son los explantes preferidos en la conservación *ex situ* de semillas recalcitrantes. Tienen ciertas ventajas como, por ejemplo, que pueden crecer en plantas enteras con simples protocolos de micropropagación, adicional, su conservación puede representar una alta diversidad genética (Ballesteros *et al.*, 2014),(Pence *et al.*, 2020).

La crio preservación a partir de este enfoque metodológico se ha ensayado en 16 especies de roble siendo logrado de forma exitosa en cuatro especies *Q. faginea*, *Q. gambellii*, *Q. rubra* y *Q. schottkyana* mostrando recuperación de raíces y brotes (Entre el 5-60%) tras la exposición a nitrógeno líquido. La supervivencia elevada, es decir, superior al 60%, considerada cuando los ejes embrionarios se expanden, reverdecen, forman callo o muestran un desarrollo normal de raíces o brotes se reporta estar asociada a plántulas que se secaron en el pretratamiento a partir de contenidos iniciales de agua mayores de $1\text{g H}_2\text{O g}^{-1}\text{ DW}$ (Dry Weight o peso seco) (Rango mayor de 50% FWB Basado en peso fresco) o entre 0.27 y $0.40\text{ g H}_2\text{O g}^{-1}\text{ DW}$ equivalente a 21-29 % FWB exceptuando la especie *Q. gambellii* la cual ha tolerado secamiento en rangos iniciales de contenido de agua 0.10 g

H₂O g⁻¹ DW (9% FWB). Todas las especies de *Quercus sp* muestran buenas tasas de supervivencia y crecimiento de las plantas cuando el congelamiento y descongelamiento se realizó relativamente rápido con tasas promedio de congelación de 3 °C s⁻¹. En cuanto al medio de recuperación, el medio WPM ha sido utilizado en todas las especies mostrando buenas tasas de supervivencia y crecimiento (Ballesteros & Pritchard, 2020) (Apéndice F). (Apéndice G).

Discusión

Las publicaciones sobre desarrollo de protocolos de micropropagación *in vitro* en el roble durante las dos primeras décadas del siglo XXI se enfocan en su mayoría a especies europeas (*Quercus. Robur*, *Quercus petarea* y *Quercus. Suber*); Norteamericanas (*Quercus rubra*, *Quercus alba* y *Quercus bicolor*), asiáticas (*Quercus leucotrichophora*, *Quercus glauca*), mediterráneo y del medio oriente (*Quercus aegilops L*, *Quercus euboica*) y las encinas mexicanas *Quercus castanea*, *Quercus eduardii*, *Quercus resinosa*, *Quercus rugosa* y *Quercus ilex*. En el caso del roble andino *Q. humboldti*, los estudios relacionados a micropropagación son escasos y datan de la primera década del siglo XXI siendo necesario establecer estudios actualizados en micropropagación en esta especie. Sin embargo, en el caso puntual de esta, los estudios hasta la fecha reportados se fundamentan en protocolos de inducción de embriogenesis somática, cultivo *in vitro* de ejes embrionarios zigóticos maduros e inmaduros, micropropagación de yemas apicales y nodos de plantulas de dos meses de edad.

Los factores que inciden en la micropropagación *in vitro* de cualquier especie son en su orden: Selección de la especie o genotipo, estado fisiológico de la planta donante y selección del explante, condiciones de asepsia, composición del medio de cultivo, condiciones ambientales de incubación y adaptación de las plantas. En el caso del roble, el genotipo ha sido un factor ampliamente estudiado especialmente en especies Europeas debido a que las poblaciones de roble blanco Europeo presentan mayor índice de diversidad debido a procesos recurrentes de hibridación interespecífica enfocada a mantener tamaños

de población elevada y facilitar el flujo genético entre poblaciones localizadas a grandes distancias (Petit et al., 2004).

En investigaciones realizadas con el *Quercus ilex* o encina Europea se encontró que el genotipo en la inducción de embriogénesis somática influye en el desarrollo de los distintos estadios del desarrollo embrionario, especialmente en el avance hacia estadios más avanzados o en su defecto en la regeneración de plántulas. Así mismo, en los mismos clones de la especie *Q. robur* se han encontrado diferencias en el porcentaje de enraizamiento Barra-Jiménez et al., (2014) ;Vidal et al (2003).

En el caso del roble Colombiano o andino, la diversidad genética es reducida por las siguientes razones: Su hábitat es muy restringido (especie endémica), sumado a ello, es catalogada como especie vulnerable según el libro rojo de plantas maderables debido a la intensa extracción maderera. Cerca del 42% de sus poblaciones han sufrido un intenso proceso de disminución de su área de ocupación (Cárdenas D., Salinas N. 2007). Por lo tanto, aun no existen estudios que asocien genotipo-micropropagación para el roble andino. En un estudio realizado sobre diversidad genética del roble en el macizo Colombiano, se encontró que la zona de fragmentación del hábitat presenta menores índices de diversidad genética debido a la interrupción del flujo de genes, caso contrario a lo que se reporta en las especies Europeas (Paz, G, 2012). Por otra parte, si bien, existen poblaciones aisladas de robles en los tres ramales de la cordillera de los Andes, lo cual presupone que dichas poblaciones podrían tener procesos de especiación alopátrica y sumado a ello, su amplio rango de distribución altitudinal que ha causado que exista una gran variabilidad morfológica, llegándose inclusive a catalogar en estudios taxonómicos antiguos que en el

territorio Colombiano existían varias subespecies de roble (*Q. humboldtii* H & B; *Q. tolimensis* H & B; *Q. almaguerensis* H & B; *Q. lindenii* De Candolle; *Eritrobalanus (Quercus) duqueana* Schwartz; *Q. colombiana* Cuatrecasas y *Q. boyacensis* Cuatrecasas). Al respecto de lo anterior, en la revisión del género *Quercus* reconoce para Colombia solo la especie *Quercus humboldtii*, agrupando en ésta las anteriormente descritas como subespecies. Müller, C. (1942). Esta clasificación fue ratificada por estudios morfológicos y moleculares desarrollados por Cavelier *et al* (1993). Si bien, se habla de la misma especie, se puede establecer que existen diferentes morfotipos a los cuales valdría la pena analizar en estudios posteriores si presentan diferente respuesta a la micropropagación *in vitro*. En conclusión, en Colombia se podría inferir que existen diferentes morfotipos los cuales podrían llegar a ser subespecies de *Quercus humboldtii*. Por ende, el genotipo sería un factor relevante si se quiere plantear estudios de micropropagación *in vitro* de la especie a futuro para el roble Colombiano. En Europa es claro que la diversidad de géneros y especies es mayor más por procesos de hibridación interespecífica generada de forma artificial y adicional, el flujo permanente de genes entre poblaciones facilitado por condiciones geográficas muy distintas a las de la zona andina. (Menos barreras geográficas entre poblaciones).

En referencia al estado fisiológico de la planta donante y el tipo de explante, un factor estudiado en el roble es la edad de los árboles donantes y el lugar del árbol donde se tomen los explantes. Se reportaron estudios donde se evalúa la incidencia de dicho factor, principalmente en la etapa de enraizamiento de brotes (Vidal *et al.*, 2003). Un caso especial es el de la especie *Quercus robur*, en el cual al evaluar la edad de la planta madre y su

efecto en el enraizamiento de brotes clonados de la parte basal y la copa de árboles maduros se obtuvo como resultado que los brotes de la parte basal en ambos clones presentan mayor capacidad de enraizamiento confirmando que los tejidos de la parte basal de los árboles presentan mejor respuesta durante el rizogénesis . Un resultado similar fue encontrado en el roble de Macedonia *Quercus euboica*. En este caso, explantes provenientes de plántulas produjeron más brotes que los que provenían de plantas adultas con una fuerte influencia de la época del año en la cual son colectados (Kartsonas & Papafotiou, 2007).

En el caso del roble colombiano, las yemas aisladas de plántulas donantes de menor edad presentan mayor tasa de supervivencia al tercer mes de subcultivo. De lo anterior es posible establecer que en el caso de árboles maduros se debe procurar tomar explantes de tejidos poco endurecidos. Sin embargo, los mejores explantes suelen asociarse con plántulas de edad corta. Este análisis es corroborado por Ramírez, H.,Guevara, M.,Escobar-Perez, R (2012) al afirmar que los explantes de plantas jóvenes tienen mayor capacidad de regeneración que aquellos provenientes de plantas adultas siendo esta condición evidente en el cultivo *in vitro* de especies forestales.

En especies del género *Quercus* los explantes más utilizados de acuerdo con los reportes de la literatura de las primeras décadas del siglo XXI son: Embriones intactos de semillas decapadas, Nodos cotidelonares, yemas apicales, ejes embrionarios cigóticos maduros e inmaduros y segmentos nodales. La embriogénesis somática a partir de óvulos tiene en cuenta el estadio de desarrollo de flores y bellotas como factor crucial en la embriogénesis somática encontrándose este tipo de respuesta en especies como el *Quercus*

illex y en el roble Colombiano *Quercus humboldtii* Constanza & et al., (2005) Barra-Jiménez et al., (2014).

Al categorizar el tipo de explantes utilizados en diferentes trabajos relacionados con micropropagación en roble podemos encontrar: Protocolos de micropropagación masiva basados en meristemas existentes (Uso de yemas apicales, segmentos nodales), Millán Orozco, (2006); Purohit, *et al.*, (2002); Kartsonas & Papafotiou, (2007); Vengadesan & Pijut, (2009); Vieitez et al., (2009); Delgadillo-Díaz, et al., (2013); Fadladeen & Toma, (2020) ; Winkeljohn et al., (2022) , protocolos de morfogénesis *do novo* u organogénesis (Uso de nodos cotidelonares y óvulos para inducción de embriogénesis somática). Barra-Jiménez *et al.*, (2014); Purohit, *et al.* (2002) y finalmente, protocolos enfocados a mejoramiento genético (rescate de ejes embrionarios cigóticos maduros e inmaduros) Constanza *et al.*, (2005).

Los protocolos de micropropagación basadas en meristemas existentes se basan en el cultivo de un tejido meristemático que puede originar un tallo con ramas múltiples que a su vez producen nuevas yemas axilares, teóricamente se necesita de diferentes subcultivos para continuar el proceso de obtención de nuevas yemas. Entre tanto, las técnicas basadas en morfogénesis *do novo* se fundamentan en la inducción de expresión genética de procesos organogénicos o embriogénicos a partir de tejidos diferenciados. (Pedroza, 2008); Ramírez, H.,Guevara, M.,Escobar-Perez, R (2012). Estos mismos autores señalan algunas ventajas y desventajas de la micropropagación masiva a partir de las técnicas anteriormente mencionadas:

Permite eficiencia en contraste con la multiplicación *in vivo*

Multiplicación de grandes cantidades de plántulas en espacios reducidos.

Hay menos restricciones aduaneras a la hora de transportar el material vegetal

Multiplicación de plantas vigorosas y libres de enfermedades

Presupone ahorro en costos de combustible y espacios de invernadero

Las condiciones controladas permiten conseguir una producción homogénea

El cultivo *in vitro* es especialmente útil para el establecimiento de banco de genes

Así mismo, hay unas desventajas como:

Estabilidad genética débil

Plantas producidas *in vitro* pueden mostrar características poco convenientes como la excesiva producción de ramas laterales y paso total a la fase juvenil.

La aclimatación de las vitroplantas al suelo es un proceso bastante delicado

Si bien, los costos de producción y mantenimiento de plantas se reducen, se requiere de una alta inversión económica inicial en el montaje de los equipos necesarios para micropropagación.

En el caso del rescate de embriones cigóticos, esta técnica consiste en aislar y cultivar embriones cigóticos inmaduros con problemas de desarrollo en un medio de cultivo artificial que contiene los requerimientos nutricionales que sustituyen al endospermo. Las principales aplicaciones del cultivo de embriones cigóticos maduros e inmaduros según

Ramírez, H.,Guevara, M.,Escobar-Perez, R (2012) son:

Recuperar embriones híbridos provenientes de cruces intra e interespecíficos.

Romper la latencia de semillas con largos periodos de latencia

Acortar el mejoramiento de especies con semillas de periodos largos de latencia.

En el caso del roble Colombiano, las semillas son recalcitrantes. Es decir, no sobreviven en condiciones de sequedad o frío cuando son conservadas *ex situ*. Por lo tanto, no pueden ser conservadas por largos periodos. Por ello, la estandarización de la técnica de cultivo de embriones es importante establecerla en esta especie (Constanza *et al*, 2005).

En cuanto a las condiciones de asepsia, el protocolo de desinfección utilizado en el rescate de embriones zigóticos maduros se tiene como referencia el protocolo de los robles del Himalaya *Quercus leucotrichophora* y *Quercus glauca* propuesto por Purohit, *et al* (2002). El proceso de desinfección incluye la separación de la cúpula de la semilla, lavado con solución de detergente y agua de grifo, enjuague con agua destilada, tratamiento con una solución de fungicida y ácido ascórbico, y desinfección de la superficie con cloruro de mercurio. Cada tratamiento es seguido por lavados en agua destilada estéril. Así mismo, se resalta el protocolo establecido por Constanza *et al.* (2005) para rescate de embriones zigóticos inmaduros y maduros en el roble Colombiano. Para el caso de semillas inmaduras, los embriones zigóticos inmaduros se obtienen eliminando la testa y escindiendo el saco embrionario. Para semillas en desarrollo y maduras, se elimina la testa y se talla una estructura en forma de cono con los cotiledones expuestos. Las semillas almacenadas se tratan de manera similar a las maduras, pero se realiza una asepsia adicional después de eliminar los tejidos superficiales de los cotiledones.

En el roble Colombiano Constanza *et al.*, (2005) mostró que el almacenamiento en frío combinado con una asepsia superficial doble afectó negativamente la viabilidad de los ejes embrionarios, mientras que la asepsia superficial sencilla aumentó considerablemente la contaminación. Se concluyó que el procedimiento de asepsia superficial es más efectivo

para eliminar los contaminantes exógenos en las semillas *de Q. humboldtii*. Este consiste en separar el cáliz y lavar con agua corriente antes de ser tratadas con una solución de hipoclorito de sodio y Tween 20. El protocolo de desinfección de embriones zigóticos en los robles mexicanos publicado por Delgadillo-Díaz, (2013) consistió en desinfectar las bellotas inicialmente separando sus cúpulas y lavándolas con agua y jabón, luego, tratarlas con etanol y una solución de hipoclorito de sodio. Después de retirar la cubierta de las semillas, los embriones intactos se tratan con una mezcla de PPM (Plant Preservative Mixture Reagent) y antioxidante. En especies de roble del medio oriente Fadladeen & Toma, (2020) concluyeron que el uso de una concentración de hipoclorito de sodio al 30% y un tiempo de exposición de 5 minutos, junto con el uso de tween 20 y enjuagues con agua destilada estéril, fue efectivo para obtener embriones somáticos saludables a partir del cultivo de embriones zigóticos.

De acuerdo con lo anterior, se puede inferir que complementar la asepsia superficial sencilla propuesta por Constanza *et al* (2005) para eliminar patógenos exógenos junto con el protocolo de desinfección propuesto por Purohit (2002) podría generar resultados interesantes en el roble Colombiano en cuanto a la desinfección de este tipo de explantes. No obstante, tendría que evaluarse si los embriones somáticos obtenidos a partir de embriones zigóticos mantendrían una buena viabilidad puesto que el cloruro de Mercurio $MgCl_2$ es un compuesto altamente tóxico y de difícil remoción en los explantes. (Mroginski, L. Roca,W. 1993). Por tanto, para establecer una desinfección que no solo sea superficial en el roble colombiano se debe tener presente los reactivos antioxidantes propuestos para los robles mexicanos si lo que se busca es mantener la viabilidad de los

embriones y tener presente la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de exposición propuesto para los robles de medio oriente.

Para efectos de la desinfección de explantes en micropropagación de nodos cotidelonares se destaca el protocolo para el roble rojo de Norteamérica *Quercus rubra L* propuesto por Vengadesan & Pijut, (2009) (Ver pag. 32). En términos prácticos, la solución de Alconox ® al 1% si se quisiera utilizar en un laboratorio de Colombia, acarrearía costos muy altos debido a que tiene que ser importado.

En protocolos de micropropagación masiva a partir de meristemos apicales, brotes primordiales, segmentos nodales y brotes juveniles y epicórmicos se destaca las investigaciones realizadas en el roble de troya *Quercus euboica* publicado por Kartsonas & Papafotiou, (2007) (Ver pág. 32) y los robles de Norteamérica propuesto por Vieitez et al., (2009) (Ver pág. 33). En referencia al protocolo usado para los segmentos nodales en el roble de troya se destacan algunos aspectos como tamaño de los esquejes que deben oscilar en un rango entre 5 a7 cm. Por lo tanto, el tamaño de los segmentos nodales es una variable a considerar dentro de la estandarización de protocolos de micropropagación a partir de este tipo de explantes. De igual manera, en los robles de Norteamérica el tamaño de los segmentos de brotes epicormicos debe oscilar en un rango entre 20 a 25 cm de largo y un espesor entre 1 y 2 cm. Estos deben ser colocados previamente en perlita humedecida manteniéndolos húmedos en una cámara de crecimiento a 25° y humedad relativa entre el 80 al 90%. Esto debe ser previo al protocolo de desinfección propiamente dicho. Una innovación reciente en protocolo de desinfección a partir de brotes juveniles en roble es el enjuague en agua destilada esterilizada en autoclave usando un filtro de osmosis inversa

(Winkeljohn et al., 2022). Finalmente si lo que se busca es establecer embriogénesis somática a partir de ovulos, es importante proponer protocolos de desinfección que no solamente se fundamenten en el uso de las sustancias, concentraciones y tiempos correctos de los respectivos reactivos sino también es importante evaluar la influencia del estadio del desarrollo de las flores (Barra-Jiménez et al., 2014).

En lo que refiere a la composición del medio de cultivo, el medio WPM (*Woody Plant Medium*) es el más frecuentemente utilizado en los protocolos de micropropagación de diferentes especies de *Quercus.sp* . Siendo utilizado en etapa de multiplicación de brotes a partir de nodos cotiledonares y explantes nodales, etapas de subcultivo a partir de embriones cotiledonares inmaduros, cultivo de ejes embrionarios zigóticos inmaduros y maduros para obtención directa de plántulas, germinación de embriones en explantes nodales, proliferación de brotes primordiales y segmentos nodales aislados de brotes epicórmicos. Adicionalmente, en etapa de enraizamiento se utiliza a la mitad de la concentración de sus sales principalmente en protocolos de micropropagación en *Quercus glauca* y *Quercus rubra L.* (Ver Tabla 2.)

El medio Murashige & Skoog (Medio MS) es reportado especialmente en el roble Colombiano *Quercus humboldtii* en la etapa de estimulación y expresión para inducir respuesta morfogénica a partir de embriones cotiledonares inmaduros. Así mismo, en el protocolo de micropropagación de embriones zigóticos de robles de México. De igual manera, en la etapa de enraizamiento de estas mismas especies, se utiliza la mitad de la concentración de las sales ($\frac{1}{2}$ MS). Con menor frecuencia se reporta el Medio GD

(Micropropagación en *Quercus rubur L*, *Quercus humboltii*, *Quercus alba*, *Quercus bicolor*). (Ver Tabla No 2.)

En referencia a los reguladores de crecimiento utilizados en los medios de cultivo, durante la etapa de subcultivos para multiplicación de brotes en la mayoría de publicaciones se reporta altas concentraciones de la citoquinina BAP (6- Bencil-aminopurina) especialmente en la micropropagación de nodos cotidelonares y yemas. Así mismo, en la proliferación de brotes primordiales y segmentos nodales aislados de brotes epicórmicos de árboles maduros, etapa de inducción y multiplicación de brotes a partir de embriones zigóticos. En investigaciones más recientes se reporta el uso de Tiosulfato de plata STS como sustancia clave en la supervivencia de brotes en etapa de multiplicación. El ácido Giberélico AG₃ y la caseína Hidrolizada son compuestos orgánicos de composición definida y no definida que se usan frecuentemente en la germinación de embriones de explantes nodales. En el roble Colombiano se reporta alta concentración en la obtención directa de plántulas a partir de ejes embrionarios zigóticos maduros. (Ver Tabla No 2.)

En etapa de enraizamiento se reporta altas concentraciones de la auxina AIB (Acido indol butírico) en la mayoría de las especies de Europa, Asia, Norteamérica y en el roble Colombiano. La auxina AIA (Ácido indol acético) en robles mexicanos y ANA (Ácido Naftlacético) en robles de medio oriente. En el roble Colombiano, altas concentración de la citoquina TDZ (Tidiaruzon) y la auxina AIA son fundamentales en la etapa de estimulación y expresión para inducir respuesta morfogénica a partir de embriones cotiledonares inmaduros. Alta concentración de la auxina AIB se requiere para la respuesta embriogénica y morfogénica en embriones cotidelonares inmaduros. (Ver Tabla 2.)

Con respecto a las condiciones de incubación en cámaras de crecimiento se menciona diferentes condiciones de incubación utilizadas en estudios de propagación *in vitro* de diferentes especies de robles. Estas condiciones incluyen temperaturas de incubación que oscilan entre los 20 °C y 25 °C, fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, intensidades luminosas que oscilan en diferentes protocolos en un rango de 10-54 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, y el uso de lámparas fluorescentes de luz blanca fría. De acuerdo con Ramírez, H., Guevara, M., Escobar-Perez, R (2012), las especies tropicales, deben tener las siguientes condiciones ambientales de incubación: Iluminación entre 1000-5000 lux, temperatura entre los 25-28° C, Fotoperiodo 16/8 y Humedad relativa 70% . En el caso del roble, de acuerdo con la revisión de la literatura, la temperatura de incubación debe ser en promedio de 25° C. Para efectos del roble andino este valor debe ser de 23° +/- 2 °C partiendo del hecho de que es una especie andina. Por tanto, no tolera temperaturas por encima de los 25° C. En el caso de la luminosidad, asumiendo un valor promedio de 30 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ al hacer la conversión a LUX en condiciones de luz fluorescente equivaldría a 2220 Lux de intensidad lumínica. En términos globales se puede deducir que la intensidad lumínica en LUX en el roble oscila entre 740 y 3220 lux. Es decir, es una especie con tendencia baja o media de luminosidad en el periodo de incubación. Como innovaciones tecnológicas recientes se menciona el efecto del Tiosulfato de Plata en la tasa de supervivencia de brotes juveniles. (Winkeljohn et al., 2022). Como se había mencionado en apartados anteriores, el uso del Tiosulfato de Plata se está implementando en propagación *in vitro* de roble con el fin de disminuir los síntomas de estrés causados por la acumulación de etileno en el frasco de cultivo (Cuba-Diaz *et al.*, 2014).

Finalmente, en términos generales, lo que respecta a la aclimatación y adaptación de las vitroplantas de roble en condiciones *in vivo* se destaca la importancia de considerar el tipo de sustrato utilizado, controlar la humedad ambiental relativa, la temperatura y la luminosidad durante este proceso. Se recomienda el uso de sustratos como vermiculita, turba, suelo-arena o suelo previamente esterilizado. Además, se menciona que es necesario mantener una alta humedad relativa debido a que las vitroplantas no tienen una cutícula desarrollada ni estomas bien desarrollados (Ramirez, Guevara, & Escobar, 2012).

Se presentan también estudios específicos sobre los efectos de la temperatura e intensidad lumínica en la tasa de fotosíntesis y transpiración en el periodo de aclimatación de robles del himalaya (Purohit, 2002). Se observa que la fotosíntesis se incrementa con una intensidad de luz óptima y una temperatura adecuada, mientras que una alta intensidad de luz junto con altas temperaturas puede afectar negativamente el intercambio de dióxido de carbono. Las condiciones óptimas para fotosíntesis deben ser de $2000 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$ y rango de temperatura entre 25 y 30° C, Para efectos del roble andino, se sabe que es una especie de bosque altoandino por tanto, podría ajustarse el rango de aclimatación entre los 20° y 25° C si lo que se busca es mantener una alta tasa fotosintética. En cuanto a la aclimatación en condiciones *ex vitro*, se menciona la importancia del sustrato utilizado, como el uso del sustrato del hábitat natural de la especie para obtener un mayor porcentaje de supervivencia y un crecimiento más vigoroso (Vengadesan & Pijut, 2009).

Se describen también protocolos de transferencia de suelo y aclimatación para diferentes especies de robles, donde se mencionan pasos como el lavado de las raíces. Un paso imprescindible posterior a dicho lavado es el trasplante de las vitroplantas a suelo

estéril y el cubrimiento con bolsas de polietileno que se va perforando gradualmente hasta que queden eliminadas completamente en un periodo de 15 a 20 días Finalmente, es importante considerar el uso de fungicidas, la transferencia a macetas con sustrato adecuado y la gradual exposición a condiciones de temperatura y humedad ambiente. Estos procesos de aclimatación pueden durar varias semanas antes de transferir las plantas a invernadero (Mroginski, L Roca, w 1993); Delgadillo-Díaz,*et al* (2013); Fadldeen & Toma, (2020).

En referencia a la crio preservación como estrategia biotecnológica en el mantenimiento de germoplasma *in vitro* de explantes de diferentes especies del género *Quercus*, se han criopreservado de forma rutinaria con fines comerciales, embriones somáticos, ejes embrionarios de semillas y yemas dormantes. En lo referente al mantenimiento de germoplasma *in vitro de* individuos del género *Quercus* a corto y mediano plazo, se ha preservado embriones somáticos obtenidos por embriogénesis secundaria con subcultivos que oscilan en periodos de mantenimiento de 4 años Ballesteros & Pritchard, (2020).

En referencia al roble Colombiano no hay reportes de trabajos relacionados con la aplicación de esta herramienta biotecnológica en procesos de conservación *ex situ*. Por lo tanto, teniendo en cuenta este argumento y el estado de vulnerabilidad de la especie, se hace necesario desarrollar investigación en este campo junto con el desarrollo de protocolos eficientes de micropropagación. Los pretratamientos para crio protección más utilizados en protocolos de crio preservación a largo plazo en embriones somáticos de individuos del género *Quercus* los cuales podrían ser utilizados en el roble colombiano *son:*

Solución de vitrificación (PVS2) durante 30 a 90 minutos, metodología de encapsulación y deshidratación con resultados de supervivencia para embriones somáticos cercanos al 90%. Este último método complementado con una desecación del 25 a 35% de contenido de agua de los explantes. Martínez et al.,(2003); Fernández et al., (2008).

El pretratamiento de brotes apicales en crio preservación es reportado en diferentes especies de roble, especialmente de Norteamérica. La metodología de crio protección consiste en la vitrificación por el método dróplet el cual consiste en incubar en grupos por 10 a 15 minutos en una solución de medio MS + 0.4 M de sacarosa + 2 M glicerol, luego, 20 minutos en solución PVS2 (Medio MS + 0.4 sacarosa + 30 % glicerol + 15% etilenglicol + 15% DMSO) Ballesteros & Pritchard, (2020); Pence & Chaiken, (2021).

La crio protección de las plúmulas en *Quercus rubur* consiste inicialmente en almacenarlas por 18 horas en una solución de sacarosa 0.5 M posterior a las pruebas de contenido de agua (WC). Este método consiste en un modelo matemático que relaciona el “contenido de agua” con el peso del material vegetal encapsulado. En el caso de yemas dormantes en especies leñosas como el roble implica establecer protocolos previos de micropropagación de estas en condiciones *in vitro*. Cuando se trata de ejes embrionarios en especies de *Quercus sp* el análisis de contenido de humedad es un factor fundamental (%FWB) junto con el indicador de peso seco DWB [(Gh2O/Gdw)]. En protocolos de crio preservación exitosos estos valores oscilan de la siguiente manera: (% FWB 9-23); (DWB 0.1 y 0.3 [(Gh2O/g DW)]) Ballesteros & Pritchard, (2020) págs. 10-11.

Las metodologías de crio preservación y descongelamiento en condiciones *in vitro* en diferentes especies de roble se fundamentan más que todo en el uso del Nitrógeno

líquido bien sea por inmersión directa de capsulas de alginato como es el caso de los embriones somáticos. (Fernandes et al., 2008) o en su defecto, el uso de crio tubos sometidos a congelación ultrarrápida con granizado de nitrógeno ultra líquido (Subenfriado a -210°C al vacío) o rápida (inmersión directa en nitrógeno líquido en crio frascos de polipropileno) como sucede con las plúmulas embrionarias. (Chmielarz *et al.*, 2011) (Sangwan & Prasanna, 2021). En el descongelamiento se utiliza técnicas como inmersión en baño de agua entre 38° a 40°C seguida de rehidratación en solución de 1.0M de Sacarosa en medio líquido MS. Este protocolo se aplica para embriones somáticos. (Fernandes et al., 2008) La sacarosa disuelta en medio MS líquido es utilizada de igual manera en el proceso de descongelamiento de brotes apicales. Al igual, en las plúmulas, el protocolo consiste en una transferencia a una solución de sacarosa 1, 2 M a 42°C por 1 minuto, seguido de una transferencia en hielo para disminuir la temperatura de la solución de sacarosa durante 2 minutos (Pence & Chaiken, 2021).

Con respecto a las pruebas de viabilidad y supervivencia de los tejidos *in vitro* crio preservados de diferentes especies de roble, es de resaltar que a partir de embriones somáticos se utilizan pruebas con marcadores moleculares AFLPs y SSR (Fernández et al. 2008).

En el caso de los brotes apicales crio preservados se ha evaluado respuesta a diferentes condiciones ambientales de las vitroplantas en la etapa de aclimatación. Una de estas variables es la tasa de supervivencia durante el proceso de recultivo en condiciones *in vitro* a partir del análisis de datos cuantitativos relacionados al crecimiento de brotes y surgimiento de hojas. (Pence & Chaiken, 2021). En el caso de las plúmulas se evalúa tasas

de supervivencia y rebrote considerando coloración verde de las plúmulas e incremento de tamaño y la aparición de brotes frondosos entre 3- 6 mm tras 8 semanas de propagación *in vitro* (Chmielarz *et al.*, 2011).

Conclusiones

Con respecto al objetivo específico: *Revisar los fundamentos teóricos para establecer protocolos de micropropagación in vitro en el roble andino Quercus humboldti Bonpland* se concluye que:

La limitada literatura sobre micropropagación en especies de roble andino contrasta con los estudios más desarrollados en especies europeas, norteamericanas, asiáticas, mediterráneas y del Medio Oriente. Esto destaca la necesidad de ampliar la investigación en técnicas de conservación para especies menos estudiadas, como el roble andino, que pueden ser igualmente importantes desde el punto de vista de la conservación genética.

Entre las técnicas de micropropagación establecidas, se destacan la micropropagación de meristemas existentes, la morfogénesis de *novo* u organogénesis, y el cultivo de embriones somáticos, especialmente desarrolladas en el roble colombiano, particularmente en poblaciones del Departamento de Boyacá. En este contexto, el cultivo de embriones emerge como una alternativa promisoriosa para la conservación *ex situ* del roble colombiano, ya que las semillas no pueden conservarse por largos periodos debido a su recalcitrancia.

Con respecto al objetivo específico: *Analizar los factores que influyen en el éxito de la conservación ex situ de Quercus humboldti Bonpland a través de la micropropagación in vitro partiendo de protocolos desarrollados en otras especies del género Quercus sp* se concluye que:

La edad de los árboles donantes y la ubicación de los explantes dentro del árbol son factores críticos que afectan la respuesta rizogénica. Se ha observado que las yemas

aisladas de plántulas más jóvenes tienen una mayor tasa de supervivencia en el cultivo *in vitro*, especialmente en el caso del roble colombiano.

El tamaño de los explantes, el número y los tiempos de enjuague en agua destilada esterilizada son aspectos importantes para considerar para garantizar la asepsia de los explantes durante el proceso de micropropagación. Se sugiere el uso de hipoclorito de sodio (NaClO_3) en los protocolos, junto con el agente emulsionante tween 20.

Se utilizan diferentes medios de cultivo, como el Medio WPM (Woody Plant Medium) y el Medio MS (Murashige & Skoog), en diversas etapas del cultivo de tejidos vegetales del roble andino. Los reguladores de crecimiento, como las citoquininas BAP y TDZ, el ácido giberélico (AG3) y las auxinas AIB, AIA y ANA, se emplean según la especie de roble y la etapa de micropropagación.

Durante la incubación, se recomienda mantener temperaturas entre 20 °C y 25 °C, fotoperíodos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, y una intensidad lumínica específica utilizando lámparas fluorescentes de luz blanca fría. Durante el proceso de aclimatación, se emplea el tiosulfato de plata para mejorar la supervivencia de los brotes juveniles. Se recomienda el uso de fungicidas y la transferencia a macetas con sustrato adecuado, manteniendo una alta humedad relativa y ajustando el rango de aclimatación según las condiciones del hábitat natural del roble andino.

Con respecto al objetivo específico: *Evaluar la potencialidad de la micropropagación in vitro como estrategia biotecnológica de conservación ex situ a partir del análisis de las técnicas orientadas a tal fin* se concluye que:

La micropropagación *in vitro* aplicada a la conservación de recursos genéticos en *Quercus humboldtii* ofrece importantes ventajas, incluyendo la producción eficiente de plantas a partir de una sola muestra, lo que facilita su propagación rápida y masiva. Esto es especialmente beneficioso para especies en peligro de extinción como el *Quercus humboldtii*, ya que permite obtener y mantener plantas en condiciones controladas. Además, esta técnica permite la selección de plantas superiores con características deseables, como resistencia a enfermedades o un crecimiento más rápido, lo que puede tener un impacto positivo en los procesos de silvicultura y reforestación.

Entre las desventajas de la micropropagación como herramienta biotecnológica de conservación *ex situ* se puede destacar en primer lugar, los costos que acarrea debido a la necesidad de equipos especializados, medios de cultivo y condiciones de laboratorio controladas. Además, existe el riesgo de contaminación de los cultivos *in vitro* por microorganismos, lo que puede afectar la calidad y viabilidad de las plantas producidas. Por último, la reducción de la variabilidad genética es una preocupación, ya que se producen clones genéticamente idénticos de la planta madre, lo que puede limitar la adaptabilidad de las plantas a diferentes condiciones ambientales.

El establecimiento de estrategias de conservación *ex situ* que hagan uso de la herramienta biotecnológica de la micropropagación *in vitro* acarrea establecer estrategias de crioconservación de tejidos a mediano y largo plazo. Los reportes de la literatura mencionan la criopreservación de embriones somáticos, ejes embrionarios de semillas y yemas dormantes de especies de *Quercus* con fines comerciales. Las especies que se les ha desarrollado protocolos de crioconservación son en su totalidad de Europa y Norteamérica.

Los pretratamientos más utilizados en la criopreservación de embriones somáticos de *Quercus* son la solución de vitrificación (PVS2) y la metodología de encapsulación y deshidratación, presentando tasas de supervivencia cercanas al 90%.

Las metodologías de criopreservación y descongelamiento en condiciones *in vitro* se basan en el uso de nitrógeno líquido, ya sea por inmersión directa en cápsulas de alginato o mediante congelación ultrarrápida en crio tubos. Finalmente, las pruebas de evaluación de viabilidad y supervivencia de los tejidos criopreservados utilizan marcadores moleculares AFLPs y SSR, así como la evaluación de las tasas de crecimiento y formación de brotes de las vitroplantas previamente crio preservadas ante diferentes condiciones ambientales de humedad relativa, temperatura y luminosidad.

Recomendaciones

La micropropagación del roble andino es un área poco estudiada con gran potencial. Se propone estandarizar métodos biotecnológicos utilizando diferentes tipos de explantes, como embriones somáticos y yemas apicales. Esta técnica permite conservar tejidos *in vitro* como una estrategia para la propagación y preservación masiva de los recursos genéticos de esta especie, cuyas semillas son recalcitrantes.

El roble andino desempeña un papel ecológico esencial en los ecosistemas altoandinos. Sin embargo, su hábitat ha sido reducido por la deforestación y la fragmentación de bosques debido a actividades humanas, lo que lo ha llevado a un estado de vulnerabilidad. Además, su lento crecimiento hace urgente implementar estrategias de conservación *ex situ* complementarias a la restauración *in situ* de corredores ecológicos.

La creación de bancos de germoplasma a partir de tejidos propagados *in vitro* es una opción prometedora, aunque no existen protocolos de conservación a corto o largo plazo, como la criopreservación, para esta especie. Este estudio ofrece bases conceptuales y antecedentes que orientan futuras investigaciones, permitiendo estandarizar protocolos de micropropagación y desarrollar proyectos de bancos de germoplasma del roble colombiano.

Referencias Bibliográficas

- Ballesteros, D., Pritchard, H. (2020). *The cryobiotechnology of oaks: An integration of approaches for the long-term ex situ conservation of Quercus species*. En: *Forests*, 11(12), 1–23. <https://doi.org/10.3390/f11121281>
- Ballesteros, D., Varghese, B., Berjak, P., Pammenter, N. (2014). *Uneven drying of zygotic embryos and embryonic axes of recalcitrant seeds: Challenges and considerations for cryopreservation*. En: *Cryobiology*, 69(1), 100–109. <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2014.05.010>
- Barra-Jiménez, A., Aronen, T. S., Alegre, J., Toribio, M. (2015). *Cryopreservation of embryogenic tissues from mature holm oak trees*. En: *Cryobiology*, 70(3), 217–225. <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2015.02.006>
- Barra-Jiménez, A., Blasco, M., Ruiz-Galea, M., Celestino, C., Alegre, J., Arrillaga, I., Toribio, M. (2014). *Cloning mature holm oak trees by somatic embryogenesis*. En: *Trees-Structure and Function*, 28(3), 657–667. <https://doi.org/10.1007/s00468-014-0979-0>
- Brennan, A., Pence, V., Taylor, M., Trader, B., Westwood, M. (2012). *The Effect of 6-Benzylaminopurine (BAP) on Bud-Forcing of Twelve oak species*. En: *Acta Hort.* 1140, 331-334 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1140.73>
- Cárdenas D., Salinas N.(Ed.). (2007). *Libro rojo de plantas. Volumen 4. Especies maderables amenazadas parte 1*. Instituto amazónico de Investigaciones científicas. SINCHI

- Cavelier J., Aide TM., Lozano G., Pulido MT., Rivera E. (1993) *Especiación del género Quercus (robles) en Colombia: un siglo y medio de incertidumbre*. Fondo FEN, Bogotá, Colombia
- Chmielarz, P., Michalak, M., Pałucka, M., Wasileńczyk, U. (2011). *Successful cryopreservation of Quercus robur plumules*. En: *Plant Cell Reports*, 30(8), 1405–1414. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1049-3>
- Costanza, E., Antolinez, T., Yira N., Ariza, M., Liana., Tovar, D. Pacheco, M. (2005). *Embriogénesis somática del roble*. En J. Pacheco, M.C Castellanos (Eds.). *Roble y pino colombiano: Aspectos biotecnológicos*. (pp 83-158). Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Colciencias.
- Cuba-Díaz, M., Acuña, D., Cordero, M., & Klagges, M. (2014). *Optimización de parámetros para la propagación in vitro de Colobanthus quitensis (Kunth) Bartl*. *Revista Gayana. Botánica*, 71(1), 58–67. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432014000100009>
- Delgadillo-Díaz de León, J., Morales-Domínguez, J.F., Santos-Díaz, M., Pérez-Molphe-Balch, E. (2013). *In vitro propagation of mexican oaks (Quercus spp.)*. *Polibotánica*, (35), 85-97. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682013000100005&lng=es&tlng=.](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682013000100005&lng=es&tlng=)
- Fadladeen & Toma. (2020). *Embryo culture and in vitro clonal propagation of oak (Quercus aegilops L.)*. *Iraqi journal of agricultural sciences*, 51(1). <https://doi.org/10.36103/ijas.v51i1.934>

- Fernández, P., Rodríguez, E., Pinto, G., Roldán-Ruiz, I., De Loose, M., Santos, C. (2008). *Cryopreservation of Quercus suber somatic embryos by encapsulation-dehydration and evaluation of genetic stability*. En: *Tree Physiology*, 28(12), 1841–1850. <https://doi.org/10.1093/treephys/28.12.1841>
- Jaramillo, S., Baena, M. (2002). *Ex Situ Conservation of Plant Genetic Resources: training module*. Alliance Biodiversity & CIAT. <https://alliancebioversityciat.org/publications-data/ex-situ-conservation-plant-genetic-resources-training-module>
- 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. En: *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, 90(1), 111–116. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9232-5>
- Lee-Espinosa, H., Murguía-González, J., Laguna-Cerda, A., García-Rosas, B., Gámez-Pastrana, M., Galindo-Tova, M., Landero-Torres I., Iglesias-Andreu, L., Santana-Buzzy, N. (2009). *Encapsulación De Embriones Somáticos*. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(2), 33–40. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2009000400006
- Manos, P. S., & Hipp, A. L. (2021). An updated infrageneric classification of the north american oaks (*Quercus* subgenus *quercus*): Review of the contribution of phylogenomic data to biogeography and species diversity. *Forests*, 12(6), 1–27. <https://doi.org/10.3390/f12060786>

- Martínez, M. T., Ballester, A., Vieitez, A. M. (2003). *Cryopreservation of embryogenic cultures of Quercus robur using desiccation and vitrification procedures*. En: *Cryobiology*, 46(2), 182–189. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00024-5](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00024-5)
- Millán Orozco, L. (2006). *Micropropagación de cuatro especies maderables tropicales de interés para Colombia, mediante técnicas de cultivo In vitro*. [Tesis doctoral Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Biología]. Minerva Repositorio Institucional DA UDS. <https://minerva.usc.es/xmlui/handle/10347/9642>
- Mroginski, L., Roca, W. (1993). *Cultivo de tejidos en la agricultura. Elementos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT
- Müller, C. (1942). *The central American Sp of Quercus*. United States Department of agriculture Library.
- Muñoz de Malajovich, M. A. (2013). *Biotecnología (2a. ed.)*. Editorial de la Universidad Nacional de Quilmes <https://elibro-net.bibliotecavirtual.unad.edu.co/es/ereader/unad/77596?page=1>
- Ögren, E. (1997). Relationship between temperature, respiratory loss of sugar and premature dehardening in dormant Scots pine seedlings. En: *Tree Physiology*, 17(1), 47–51. <https://doi.org/10.1093/treephys/17.1.47>
- Paz, G. (2012). *Variabilidad genética del roble común (Quercus humboldtii bonpl.) en la región del macizo colombiano*. En *Biotecnología en el Sector Agropecuario*

y Agroindustrial: BSAA, Vol 10 No. 2 (pp 110 - 116).

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6117635>

Pedroza J. (2008). *Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en condiciones in vitro*. Facultad de Ciencias y Educación. Proyecto Curricular de Licenciatura en Biología. Universidad Distrital Francisco José de Caldas

Pence, V. C., Ballesteros, D., Walters, C., Reed, B. M., Philpott, M., Dixon, K. W., Pritchard, H.W., Culley, T. M., Vanhove, A.C. (2020). *Cryobiotechnologies: Tools for expanding long-term ex situ conservation to all plant species*. En: *Biological Conservation*, 250, <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2020.108736>

Pence, V. C., Chaiken, M. F. (2021). Shoot Tip Cryopreservation as a Conservation Tool for Species of *Quercus*: Effects of Species and Environment on Recovery. En: *Cryo Letters*, 42(3), 159–167. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33970994/>

Perea, M. (2009). *Cultivo de tejidos vegetales in vitro*. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.

Petit, R. J., Bodénès, C., Ducousso, A., Roussel, G., & Kremer, A. (2004). *Hybridization as a mechanism of invasion in oaks*. *New Phytologist*, 161(1), 151–164. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00944>.

Ramírez, H., Guevara, M., Escobar-Perez, R (2012). *Cultivo de Tejidos Vegetales. Conceptos y prácticas*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Colombia. Sede palmira.

- Ramos, J. (2012). *Avances de la propagación in vitro de especies leñosas* [Monografía Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD. Especialización en Biotecnología Agraria]. <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/2515>
- Sangwan, S., & Prasanna, R. (2021). *Mycorrhizae Helper Bacteria: Unlocking Their Potential as Bioenhancers of Plant–Arbuscular Mycorrhizal Fungal Associations*. *Microbial Ecology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01831-7>
- Vengadesan, G., Pijut, P. M. (2009). *In vitro propagation of northern red oak (Quercus rubra L)*. En: *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 45(4), 474–482. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9182-6>
- Verleysen, H., Samyn, G., Van Bockstaele, E., Debergh, P. (2004). *Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation*. En: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77(1), 11–21. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000016483.00158.a9>
- Vidal, N., Arellano, G., San-José, M. C., Vieitez, A. M., Ballester, A. (2003). *Developmental stages during the rooting of in-vitro-cultured Quercus robur shoots from material of juvenile and mature origin*. En: *Tree Physiology*, 23(18), 1247–1254. <https://doi.org/10.1093/treephys/23.18.1247>
- Vieitez, A. M., 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*. En *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 98(2), 135–145. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9546-6>

- Vieitez, A. M., Corredoira, E., Martínez, M. T., San-José, M. C., Sánchez, C., Valladares, S., Vidal, N., Ballester, A. (2012). *Application of biotechnological tools to Quercus improvement*. En: European Journal of Forest Research, *131*(3), 519–539. <https://doi.org/10.1007/s10342-011-0526-0>
- Whiters, L., Williams, J. (1985). *Research on long-term storage and exchange of in vitro plant germplasm*. En: Biotechnology in international agricultural research (pp 11-25). https://books.irri.org/9711041243_content.pdf
- Winkeljohn, M., Pence, V. C., Culley, T. M. (2022). *Improving culture initiation of mature oak shoots through use of silver thiosulfate*. En: Applications in Plant Sciences, *10*(5), 1–8. <https://doi.org/10.1002/aps3.11497>

Apéndices

Apéndice A

Concentración De Sales Y Vitaminas Medio MS

Sales y Vitaminas	Concentración mg /L
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
KH ₂ P O ₄	170
F eSO ₄ . 7H ₂ O	27,8
NaEDTA	37,3
MnSO ₄ . 4H ₂ O	16,9
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,63
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025
Tiamina	0,1
Acido nicotínico	0,5
Piridoxina	0,5
Glicina	2,0
Inositol	100
Sacarosa	30.000
pH	5,7

Nota. Tomado de Ballesteros & Pritchard (2020)

Apéndice B*Composición del Medio Gamborg (1968)*

Sales y Vitaminas	Concentración mg /L
(NH ₄) SO ₄	134
MgSO ₄ . 7H ₂ O	500
CaCl ₂ . 2H ₂ O	150
KNO ₃	3000
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	150
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37.3
MnSO ₄ . 4H ₂ O	10(1H ₂ O)
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	2
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025
KI	0.75
H ₃ BO ₃	3
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25
Inositol	100
Tiamina	10
Acido nicotínico	1,0
Piridoxina	1,0
Sacarosa	20.000
pH	5,7

Apéndice C*Composición del Medio Schenk- Hildebrandt (1972)*

Sales y Vitaminas	Concentración mg /L
MgSO ₄ . 7H ₂ O	400
CaCl ₂ . 2H ₂ O	200
KNO ₃	2500
NaH ₂ PO ₄	300
FeSO ₄ . 7H ₂ O	15
Na ₂ EDTA	20
MnSO ₄ . 4H ₂ O	10
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.1
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.2
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.1
KI	1.0
H ₃ BO ₃	5
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.1
Inositol	1000
Tiamina	5
Acido nicotínico	0.5
Piridoxina	0.5
Sacarosa	30000
pH	5,7

Apéndice D

Composición del Medio: "Woody Plant Medium" WPM

Sales y Vitaminas	Concentración mg /L
NH ₄ NO ₃	400
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Ca (NO ₃) ₂ 4H ₂ O	556
K ₂ SO ₄	990
H ₂ BO ₃	6.2
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3
Tiamina HCl	1.0
Piridoxina HCl	0.5
Ácido nicotínico	0.5
Glicina	2.0
Myo-inositol	100
Ácido ascórbico	100
Sacarosa	30000
Agar	6500
pH	5,7

Nota. Tomado de G., Lloyd., B., McCown. (1981).

Apéndice E

Formulaciones de Medios para el Cultivo de Ejes Embrionarios en el Roble Colombiano

Quercus humboldtii.

Concentración (mg/L)			
Sales y Vitaminas	Medio Durzan	Medio QL	Medio Heller
NH ₄ NO ₃	1600	400	0
KNO ₃	170	1800	0
CaCl ₂ · 2H ₂ O		75	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	360	250
KH ₂ PO ₄	170	270	170
(NH ₄) ₂ SO ₄			125
Ca (NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	980	200	
KCl			750
K ₂ SO ₄			
NaNO ₃			600

Nota. Tomado de Constanza et al., (2005) p. 111

Apéndice F

Criopreservación Exitosa de Ejes Embrionarios en Especies de Quercus sp

Especie	Disecación	Contenido de Humedad (% FWB)	Indicador de peso seco DWB [(gH ₂ O/gDW)]	Enfriamiento	Descongelamiento	Referencia
<i>Q. faginea</i>	Aire en campana de flujo laminar.	21	0.27	Crioviales e inmersión en nitrógeno líquido	Baño de María a 40° C por 1 minuto	(Gonzalez-Benito & Perez-Ruiz, 1992)
<i>Q. gambelii</i>	Secado instantáneo	9	0.1	Paquetes de aluminio sumergido en aguanieve de nitrógeno líquido. (-30 a -80 °C s ⁻¹)	Ejes inmersos en 0.5 M de Sacarosa calentada a 42° C.	(Xia et al., 2014)
<i>Q. gambelii</i>	Secado Instantáneo	17	0.2	Crioviales e inmersión en nitrógeno líquido. Congelamiento progresivo (3-8° C s ⁻¹).	Ejes inmersos en 0.5 M de Sacarosa calentada a 42° C	(Xia et al., 2014)
<i>Q. robur</i>	Secado Instantáneo	21	0.27	Ejes desnudos sumergidos en isopentano contenido en un reservorio de Nitrógeno líquido.	Ejes embrionarios sumergidos en una solución que contiene Ca ²⁺ y Mg ²⁺	Berjak, P. et al. (1999).
<i>Q. rubra</i>	Secado Instantáneo	23	0.3	Paquetes de aluminio sumergido en aguanieve de nitrógeno líquido. (-30 a -80°C s ⁻¹)	Ejes inmersos en 0.5 M de Sacarosa calentada a 42° C	(Xia et al., 2014)
<i>Q. rubra</i>	Secado Instantáneo	23	0.3	Crioviales e inmersión en nitrógeno líquido. Congelamiento progresivo (8°Cs ⁻¹) criopreservación exitosa de ejes embrionarios en especies de <i>Quercus sp</i> (Ballesteros & Pritchard, 2020)	Ejes inmersos en 0.5 M de Sacarosa calentada a 42° C	(Xia et al., 2014)

Nota. Tomado de Ballesteros & Pritchard,(2020)

Apéndice G

Criopreservación Exitosa de Ejes Embrionarios en Especies de Quercus sp

Especie	Medio de cultivo basal para recultivo	Concentración de reguladores de crecimiento	Porcentaje de Supervivencia (%)	Porcentaje de Formación de plantas (%)	Referencia
<i>Q.faginea</i>	WPM + Vitaminas MS	1.5 mg/L ⁻¹ BAP	75	60 ^a	Gonzalez-Benito & Perez-Ruiz, 1992)
<i>Q. gambelii</i>	WPM + 0.3 % Carbón activado	Ninguna	90	3	(Xia et al., 2014)
<i>Q. gambelii</i>	WPM + 0.3 % Carbón activado	ninguna	90	3	(Xia et al., 2014)
<i>Q. robur</i>	N/A	N/A	100	0 ^d	Berjak, P. <i>et al.</i> (1999).
<i>Q. rubra</i>	WPM + 0.3 % Carbón activado	N/A	90	60	(Xia et al., 2014)
<i>Q. rubra</i>	WPM + 0.3 % Carbón activado	N/A	90	40	(Xia et al., 2014)

Nota. Tomado de (Ballesteros & Pritchard, 2020)