

IN VITRO PROPAGATION OF *Quercus sideroxyla* FROM MATURE ACORNS

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Quercus sideroxyla* A PARTIR DE BELLOTAS MADURAS

Jessica Barragán-Zúñiga¹, Nuria E. Rocha-Guzmán¹, José B. Montoya-Ayón², José A. Gallegos-Infante¹,
Martha R. Moreno-Jiménez¹, José Á. Sigala-Rodríguez³, Cecilia Pulido-Díaz⁴,
Jorge A. Chávez-Simental^{4*}, Rubén F. González-Laredo^{1*}

¹TecNM-Instituto Tecnológico de Durango, Blvd. Felipe Pescador 1830 Ote., Col. Nueva Vizcaya, C.P. 34080 Durango, Durango, México. ²TecNM-Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana. km. 22.5 Carretera Durango-México, Ejido Villa Montemorelos, C.P. 34371 Durango, Durango, México. ³Campo Experimental Valle del Guadiana (INIFAP). Km. 5 Carretera Durango-El Mezquital Durango, C.P. 34170 Durango, México. ⁴Instituto de Silvicultura e Industria de la Madera (ISIMA-UJED). Blvd. Guadiana #501, Ciudad Universitaria, C.P. 34120 Durango, Durango, México. (jorge.chavez@ujed.mx; rubenfgl@itdurango.edu.mx).

ABSTRACT

Quercus sideroxyla is used to produce firewood, carbon and paper pulp. However, there are no management programs for replacing plants, so their conservation status is in danger in some areas of Mexico. The aim of this study was to develop an efficient methodology for *in vitro* propagation of *Q. sideroxyla*. Acorns in the fruiting season were harvested and then analyzed by X-ray. The embryos were induced to germination (stage 1), induction of adventitious shoots (stage 2) and rooting in culture media (stage 3). Four concentrations of Quoirin-Lepovire medium (QL 10, 20, 30, 40%) were used with and without activated carbon (AC), as well as silver nanoparticles (AgNp) in stage 1. Whilst in stage 2 and stage 3, only the best resulting QL concentration was tested with three concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP) and naphthalene acetic acid (NAA) as growth promoters. Experimental analysis in germination was carried out as a completely randomized block design, 16 treatments with five replicates and the Fisher test ($p \leq 0.05$) for means. Joint analysis of germination and shoots induction included a principal component analysis (PCA); induction and rooting of shoots were analyzed with the Wilcoxon paired analysis. The best results in the germination stage were observed in the treatment QL 30%, where 70% of germinated explants were obtained; but this treatment was not statistically different to the treatment QL 40%, which produced about 65% germination. In the remaining concentrations, explants oxidized completely; thus, a negative correlation medium-germination was observed. For multiple shoots induction stage, the best treatment was the lowest concentration of BAP:NAA which showed a positive behavior in the presence of activated carbon. Activated

RESUMEN

Quercus sideroxyla se utiliza para producir leña, carbón y celulosa para papel. No hay programas de manejo para reemplazar plantas, por lo tanto, su conservación está en peligro en algunas áreas de México. El objetivo de este estudio fue desarrollar una metodología eficiente para la propagación *in vitro* de *Q. sideroxyla*. Las bellotas se cosecharon en etapa de fructificación y después se analizaron con rayos X. Los embriones se indujeron a germinación (etapa 1), producción de brotes múltiples (etapa 2) y enraizamiento en medio de cultivo (etapa 3). Cuatro concentraciones de medio Quoirin-Lepovire (QL 10, 20, 30 y 40%) se usaron con y sin carbón activado (CA), así como nanopartículas de plata (AgNp) en la etapa 1. Mientras en la etapa 2 y etapa 3, solo la concentración de medio QL con mejor resultado se probó con tres concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido naftaleno acético (ANA) como promotores del crecimiento. El análisis estadístico de germinación se realizó como un diseño de bloques completos aleatorizados, 16 tratamientos con cinco repeticiones y la prueba de Fisher ($p \leq 0.05$). El análisis conjunto de la germinación con la etapa de inducción de brotes incluyó componentes principales (PCA); la inducción y el enraizamiento de brotes se analizaron con la prueba por pares de Wilcoxon. Los mejores resultados en germinación correspondieron al tratamiento QL 30%, con el 70% de explantes germinados. No hubo diferencia estadística entre este tratamiento y el QL 40%, el cual produjo aproximadamente el 65% de germinación. En las demás concentraciones los explantes se oxidaron por completo, así que la correlación medio-germinación fue negativa. En la etapa de inducción de brotes múltiples, el mejor tratamiento fue la concentración menor de BAP:ANA y mostró un comportamiento positivo en presencia de carbón activado. El carbón activado en medios de cultivo, inhibió la oxidación de las bellotas y promovió los brotes adventicios y el crecimiento de las raíces. Este es el primer informe sobre micropropagación exitosa de

* Author for correspondence ❖ Autor responsable.

Received: April, 2018. Approved: December, 2018.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 54: 129-145. 2020.

carbon on culture media, inhibited the oxidation of acorns and promoted the adventitious shoots and roots growth. This is the first report of the successful micropropagation of *Q. sideroxyla*. Using QL medium, activated carbon, silver nanoparticles and growth regulators promoted explant germination, rooting and vegetative development.

Keywords: oak, *Quercus sideroxyla*, micropropagation, rooting, adventitious shoots, activated carbon.

INTRODUCTION

Plants of the *Quercus* genus are the second group of importance among timber species of temperate-cold climate in México, due to its abundance and distribution (CONAFOR, 2007). The oaks have an ecological importance since they mediate in the stabilization of soils, avoiding erosion by providing litter, nutrients and humus. They also improve the microclimate by providing shade, preserving the aquifer and moisture in their environment (Reyes-Jaramillo, 2006). Oaks function as food and shelter to many insects, birds and mammals (Johnson *et al.*, 2002) and promote the growth of other plant species, forming ectotrophic mycorrhizal relationships with *Amanita*, *Russula*, *Lactarius*, *Boletus* and *Scleroderma* (Arizaga *et al.*, 2009). Although 44% of the surface of the state of Durango, México, has suitable habitats for the development of the *Quercus* genus, oak forests have been poorly exploited for carbon and timber (Bacon-Sobbe, 1997). The oak and pine forests cover 21% of the country, accounting for 24% of the recorded flora (Rzedowski, 1998). However, biodiversity in these forests is severely lost, as 25% of the forest territory is used for agriculture and livestock (Mas *et al.*, 2004). In fact, by 2007, the total area of oak, oak-pine and pine-oak forests had decreased by 8 654 097 ha (SEMARNAT, 2012). These lands are used now for livestock and agricultural purposes, where the application of fire is a common practice. Although this is not a process exclusive to oaks, these communities occupy strategic areas in watersheds, so that erosion that affects the substrates on the forests produces deleterious effects both in that region and at a distance, causing drying of springs, water pollution, floods, among other effects (Rzedowski, 2006).

Non-timber products from oaks represent important economic, social and cultural values, which are used for feeding, medicinal and artisanal

Q. sideroxyla. El uso del medio QL, carbón activado, nanopartículas de plata y reguladores del crecimiento promovió la germinación del explante, el enraizamiento y el desarrollo vegetativo.

Palabras clave: encino, *Quercus sideroxyla*, micropropagación, enraizamiento, brotes adventicios, carbón activado.

INTRODUCCIÓN

Las plantas del género *Quercus* son el segundo grupo de importancia entre las especies de madera de clima templado-frío en México, debido a su abundancia y distribución (CONAFOR, 2007). Los encinos tienen una importancia ecológica ya que intervienen en la estabilización de los suelos, evitan la erosión al aportar hojarasca, nutrientes y humus; también mejoran el microclima al proporcionar sombra, conservar el acuífero y la humedad del ambiente (Reyes-Jaramillo, 2006). Los encinos sirven como alimento y refugio para muchos insectos, aves y mamíferos (Johnson *et al.*, 2002) y promueven el crecimiento de otras especies de plantas, al formar relaciones micorrizales ectotróficas con *Amanita*, *Russula*, *Lactarius*, *Boletus* y *Scleroderma* (Arizaga *et al.*, 2009). Aunque el 44% de la superficie del estado de Durango, México, contiene hábitats adecuados para el desarrollo del género *Quercus*, los bosques de encino se han subutilizado para obtener carbón y madera (Bacon-Sobbe, 1997). Los bosques de encino y pino cubren el 21% del país, y contribuyen con el 24% de la flora registrada (Rzedowski, 1998). Sin embargo, la biodiversidad en estos bosques se ha perdido de forma severa, ya que el 25% del territorio forestal se utiliza para la agricultura y la ganadería (Mas *et al.*, 2004). De hecho, en 2007, el área total de bosques de encino, encino-pino y pino-encino había disminuido en 8 654 097 ha (SEMARNAT, 2012). Estas tierras se usan ahora con fines ganaderos y agrícolas, donde la aplicación del fuego es una práctica común. Si bien este no es un proceso exclusivo de los encinos, estas comunidades ocupan áreas estratégicas en las cuencas hidrográficas, por lo tanto, la erosión que afecta a los sustratos en los bosques produce efectos nocivos tanto en esa región como a cierta distancia, y causa que los manantiales se sequen, contaminación del agua, inundaciones, entre otros efectos (Rzedowski, 2006).

Los productos no maderables de los encinos representan valores económicos, sociales y culturales importantes, porque se utilizan con fines alimenticios,

purposes. In diverse ethnic communities of the country, procurement and elaboration of medicinal or food products form part of their culture; within these species is *Quercus sideroxyla* Humb. & Bonpl. (Luna-José *et al.*, 2003).

Quercus sideroxyla, a tree of 5-8 m of height and 20-60 cm diameter (Arizaga *et al.*, 2009), is an endemic species of México and distributed in Durango, Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Jalisco, Nayarit, Nuevo Leon, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas and Zacatecas states. Oaks are studied at the Technological Institute of Durango, in search for non-timber uses of these forest species in the region. Foliar infusion of *Q. sideroxyla* shows anti-inflammatory and anti-proliferative activity in a model of colon cancer, which is attributed to the presence of phenolic compounds (Moreno-Jiménez *et al.*, 2015). However, this species is traditionally used for the production of firewood, carbon and paper pulp.

At El Salto, Pueblo Nuevo, Durango, significant volumes of *Q. sideroxyla* are transformed into timber products (Nájera-Luna *et al.*, 2006). Species conservation status is in danger in some areas of the country and there are no management programs for its use (Arizaga *et al.*, 2009). Besides, by 2050 and due to climate change, the current geographic distribution of oaks will suffer a decrease from 7 to 48%, being *Q. sideroxyla* one of the four most vulnerable species. Therefore, it is necessary to define strategies for the long-term conservation of these species (Gómez-Mendoza and Arriaga, 2007). However, any option is complex by the fact that oaks are trees whose fruiting is irregular and their seeds are recalcitrant, so they cannot be stored for long periods of time (Díaz-Pontones and Reyes-Jaramillo, 2009). Moreover, only 1% of acorns are available, as many become consumed by insects and mammals (Gribko *et al.*, 2002). This furthermore complicates the production of seedlings from these species, if there is no program for reforestation (Pérez-Olvera *et al.*, 2000). Thus, *in vitro* propagation could be an attractive alternative to solve these problems and allow the rapid multiplication of the species (Delgadillo-Díaz de León *et al.*, 2013).

Micropropagation of oaks from axillary shoots was described for *Q. robur* L. (Favre and Juncker, 1987; San-José *et al.*, 1990) *Q. petraea* (Matt.) Liebl., *Q. suber* L. (Manzanera and Pardos, 1990), *Q. alba* L. and *Q. rubra* L. (Schwarz and Schlarbaum, 1993). Cotyledonary nodes were used as explants in *Q.*

medicinales y artesanales. En comunidades étnicas diversas del país, la adquisición y elaboración de productos medicinales o alimenticios forman parte de su cultura; dentro de estas especies se encuentra *Quercus sideroxyla* Humb. & Bonpl. (Luna-José *et al.*, 2003).

Quercus sideroxyla, un árbol de 5 a 8 m de altura y 20 a 60 cm de diámetro (Arizaga *et al.*, 2009), es una especie endémica de México, y se distribuye en los estados de Durango, Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Jalisco, Nayarit, Nuevo León, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas. Los encinos se han estudiado en el Instituto Tecnológico de Durango, en la búsqueda de usos no maderables de estas especies forestales en la región. La infusión foliar de *Q. sideroxyla* muestra actividad antiinflamatoria y antiproliferativa en una modalidad de cáncer de colon, lo cual se atribuye a la presencia de compuestos fenólicos (Moreno-Jiménez *et al.*, 2015). Sin embargo, esta especie se utiliza en forma tradicional para la producción de leña, carbón y pulpa de celulosa para papel.

En El Salto, Pueblo Nuevo, Durango, volúmenes importantes de *Q. sideroxyla* se transforman en productos maderables (Nájera-Luna *et al.*, 2006). El estatus de conservación de la especie es en peligro en algunas áreas del país y no existen programas de manejo para su uso (Arizaga *et al.*, 2009). Además, se prevé que para 2050 y debido al cambio climático, la distribución geográfica actual de los encinos sufrirá una disminución del 7 al 48%, con *Q. sideroxyla* como una de las cuatro especies más vulnerables. Por lo tanto, es necesario definir estrategias para la conservación a largo plazo de estas especies (Gómez-Mendoza y Arriaga, 2007). Sin embargo, cualquier opción es compleja por el hecho de que los encinos son árboles cuya fructificación es irregular y sus semillas son recalcitrantes, por lo que no se pueden almacenar por períodos largos de tiempo (Díaz-Pontones y Reyes-Jaramillo, 2009). Además, solo el 1% de las bellotas están disponibles, ya que insectos y mamíferos consumen muchas de ellas (Gribko *et al.*, 2002). Esto complica aún más la producción de plántulas de estas especies, sin un programa de reforestación (Pérez-Olvera *et al.*, 2000). Por lo tanto, la propagación *in vitro* podría ser una alternativa atractiva para resolver estos problemas y permitir la multiplicación rápida de la especie (Delgadillo-Díaz de León *et al.*, 2013).

floribunda Lindl. Ex Wall. (Purohit *et al.*, 2002a), *Q. leucotrichophora* L., *Q. glauca* Thunb. (Purohit *et al.*, 2002b), *Q. rubra* L. (Vengadesan and Pijut, 2009) and *Q. euboica* Pap. (Kartsonas and Papafotiou, 2007). Additionally, petiole tubes from *Q. semecarpifolia* Sm. (Tamta *et al.*, 2008), and embryos from *Q. suber* L. 1753 (Pintos *et al.*, 2010), and *Q. serrata* Thunb (Pandey and Tamta, 2014) have been used. However, only one report was found for the *in vitro* propagation of Mexican species, from embryos of *Q. castanea* Née, *Q. eduardii* Trel, *Q. resinosa* Liebm and *Q. rugosa* Née (Delgadillo-Díaz de León *et al.*, 2013).

This research was established with the aim of generating an efficient methodology for the *in vitro* propagation of *Q. sideroxyla* Humb. & Bonpl, determining the optimal germination and regeneration conditions of seedlings from mature acorns, induction of multiple shoots and subsequent rooting.

MATERIALS AND METHODS

Seed collection

Intact acorns of *Q. sideroxyla* Humb. & Bonpl. acorns were collected from a tree during its fruiting season (October, 2015) at the freeway Durango-El Salto road km 54 (23° 54' 86" N, 105° 00' 67" W and altitude of 2583 m). The region is an oak-pine forest where the dominant plants are oaks, the area presenting an intermediate moisture condition, high solar radiation and shallow soil.

Viability test

An X-ray analysis was performed on 400 acorns of *Q. sideroxyla*, using a Faxitron X-ray equipment (Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, IL, USA), calibrated at 17 s and 28 kV power (kVp). The percentage of acorns with some degree of separation or fracture (cotyledon-cotyledon and cotyledon-pericarp), infested and healthy were recorded.

Preparation and disinfection of vegetal material

Healthy mature acorns of *Q. sideroxyla* were selected. Oak nuts were separated from their cupule and sanded to practice a mechanical scarification on the pericarp, which was removed. Afterwards, disinfection of oak embryos was performed according to Delgadillo-Díaz de León *et al.* (2013) with slight modifications: the use of Quoirin & Lepoivre (QL) medium at different concentrations to evaluate the optimum percentage, and

La micropropagación de encinos a partir de brotes axilares se ha descrito en *Q. robur* L. (Favre and Juncker, 1987; San-José *et al.*, 1990) *Q. pe-traea* (Matt.) Liebl., *Q. suber* L. (Manzanera and Pardos, 1990), *Q. alba* L. y *Q. rubra* L. (Schwarz and Schlarbaum, 1993). Nodos cotiledonares se han usado como explantes en *Q. floribunda* Lindl. Ex Wall. (Purohit *et al.*, 2002a), *Q. leucotrichophora* L., *Q. glauca* Thunb. (Purohit *et al.*, 2002b), *Q. rubra* L. (Vengadesan and Pijut, 2009) and *Q. euboica* Pap. (Kartsonas and Papafotiou, 2007). Además, tubos de peciolo de *Q. semecarpifolia* Sm. se han utilizado (Tamta *et al.*, 2008), y embriones de *Q. suber* L. 1753 (Pintos *et al.*, 2010), y *Q. serrata* Thunb (Pandey y Tamta, 2014). Sin embargo, solo un informe se encontró sobre la propagación *in vitro* de especies mexicanas, a partir de embriones de *Q. castanea* Née, *Q. eduardii* Trel, *Q. resinosa* Liebm y *Q. rugosa* Née (Delgadillo-Díaz de León *et al.*, 2013).

Esta investigación se estableció con el objetivo de generar una metodología eficiente para la propagación *in vitro* de *Q. sideroxyla* Humb. & Bonpl, para la determinación de las condiciones óptimas para la germinación y regeneración de plántulas a partir de bellotas maduras, con la inducción de brotes múltiples, seguida de enraizamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta de semillas

Bellotas intactas de *Q. sideroxyla* Humb. & Bonpl. se recolectaron de un árbol durante su temporada de fructificación (octubre 2015) en la carretera Durango-El Salto, km 54 (23° 54' 86" N, 105° 00' 67" W y altitud de 2583 m). La región es un bosque de encino-pino donde las plantas dominantes son encinos y el área presenta una condición de humedad intermedia, radiación solar alta y suelo poco profundo.

Prueba de viabilidad

Un análisis de rayos X se realizó en 400 bellotas de *Q. sideroxyla*, con el uso de un equipo de rayos X Faxitron (Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, IL, EUA), calibrado a 17 s y 28 kV de potencia (kVp). Los porcentajes de bellotas con cierto grado de separación o fractura (cotiledón-cotiledón y cotiledón-pericarpio), infestadas y sanas se registraron.

the addition of activated carbon (AC) and silver nanoparticles (AgNP). The embryos were rinsed with tap water followed by three washes for 5 min with antibacterial soap (1% v/v), then rinsed with distilled water. They were treated with 70% (v/v) ethanol for 1 min and with sterile distilled water another minute. They were washed with a 15% commercial bleach solution plus one drop of antibacterial soap for a period of 15 min. Three rinses were made with sterile distilled water for 3, 5 and 7 min.

***In vitro* germination**

An embryo per flask was placed with 30 mL of nutrient medium QL (Quoirin and Lepoivre, 1977) at concentrations of 10, 20, 30 and 40%; pH was adjusted at 5.7 with 3% (w/v) sucrose and solidified with 0.4% Phytigel™ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) with and without activated carbon (AC) (2 g L⁻¹), as well as the absence and presence of silver nanoparticles (25 mL L⁻¹) to assess the degree of contamination. This activity was performed in a laminar flow hood under sterile conditions. All cultures were maintained for two weeks in dark conditions at 22 °C to induce germination. After the darkness period, they were transferred to periodic light settings with a photoperiod of 16/8 h light/darkness cycles at 25 °C, and relative humidity of 80% for two weeks. Corresponding data on the percentage of explants, radicle/root length, contamination and oxidation were recorded weekly and at the end of treatment (4 weeks).

The influence of the concentration of QL medium and presence of AC on total/partial oxidation of embryos and germination, as well the presence of AgNP on contamination and germination were evaluated.

Induction to multiple shoots

The explants with no evident contamination in the medium or total oxidation were transferred for induction to multiple shoots into culture vessels. They were added with 40 mL of QL 30% medium (pH 5.7), 3% (w/v) of sucrose, AgNP (250 mL L⁻¹), solidified with 0.4% (w/v) Phytigel™ and added with 6-benzylaminopurine (BAP) and naphthalene acetic acid (NAA).

At this stage the factors evaluated were three proportions of BAP:NAA hormones (1.0:0.1, 1.5:0.15 and 2.0:0.2 mg L⁻¹) and the presence of AC (2 g L⁻¹). The explants were placed on QL 30% medium enriched as described in the paragraph above and with AC (as it was the best medium option found in stage 1). They were maintained with a photoperiod of 16/8 h light/darkness at 25 °C and with a relative humidity of 80%. Observations on shoot number, size and oxidation degree in the medium were recorded after 120 d.

Preparación y desinfección de material vegetal

Bellotas maduras sanas de *Quercus sideroxylla* se seleccionaron. Las nueces se separaron de sus cúpulas y se lijaron para realizar una escarificación mecánica del pericarpio, el cual se retiró. Después se realizó la desinfección de los embriones de acuerdo con Delgadillo-Díaz de León *et al.* (2013) con modificaciones ligeras: el uso de medio Quoirin y Lepoivre (QL) en concentraciones diferentes para evaluar el porcentaje óptimo, y la adición de carbón activado (CA) y nanopartículas de plata (AgNP). Los embriones se enjuagaron con agua corriente seguido de tres lavados durante 5 min con jabón antibacterial (1% v/v), luego se enjuagaron con agua destilada; se trataron con etanol al 70% (v/v) durante 1 min y con agua destilada estéril durante otro minuto; se lavaron con una solución de cloro comercial al 15% más una gota de jabón antibacterial durante un período de 15 min. Tres enjuagues se realizaron con agua destilada estéril durante 3, 5 y 7 min.

Germinación *in vitro*

Un embrión por frasco se colocó en 30 mL de medio nutritivo QL (Quoirin y Lepoivre, 1977) en concentraciones de 10, 20, 30 y 40%; el pH se ajustó a 5.7 con 3% (p/v) de sacarosa y se solidificó con Phytigel™ al 0.4% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) con y sin carbón activado (CA) (2 g L⁻¹), así como con ausencia y presencia de nanopartículas de plata (250 mL L⁻¹) para evaluar el grado de contaminación. Esta actividad se realizó bajo una campana de flujo laminar en condiciones estériles. Todos los cultivos se mantuvieron durante dos semanas en condiciones de oscuridad a 22 °C para inducir la germinación. Después del período de oscuridad, los cultivos se transfirieron a condiciones periódicas de luz con un fotoperiodo de ciclos de 16/8 h luz/oscuridad a 25 °C y en humedad relativa de 80% durante dos semanas. Los datos correspondientes al porcentaje de explantes, la longitud de radícula y raíz, contaminación y oxidación se registraron con frecuencia semanal y al final del tratamiento (4 semanas).

La influencia de la concentración de medio QL y la presencia de CA sobre la oxidación parcial o total de embriones y la germinación se evaluaron, así como la presencia de AgNP sobre la contaminación y la germinación.

Inducción de brotes múltiples

Los explantes que no presentaron contaminación en el medio, ni oxidación total, se transfirieron a recipientes de cultivo para la inducción de brotes múltiples. Al recipiente se añadieron 40 mL de medio QL 30% (pH 5.7), 3% (p/v) de sacarosa, AgNP

Rooting of shoots

The shoots were dissected using a scalpel in the laminar flow hood and transferred to culture vessels with 40 mL of QL 40% medium, pH 5.7, 3% (w/v) of sucrose, solidified with 0.4% (w/v) Phytigel™ and added with NAA and BAP growth regulators. As in the previous stage, three proportions of hormones, now reversed NAA:BAP (1.0:0.1, 1.5:0.15 and 2.0:0.2 mg L⁻¹), were evaluated as well as the addition of AC (2 g L⁻¹). Cultures were maintained at photoperiods of 16/8 h light/darkness at 25 °C and relative humidity of 80%. Observations on the percentage of rooting were recorded after 60 d.

Statistical analysis

Research was performed in three stages: germination, induction to multiple shoots and rooting of shoots. First stage (germination) in a factorial arrangement (4×2×2) was analyzed as a complete randomized block design, with 16 treatments in five replications, stratified by the third factor: with or without activated carbon (AC). Within each AC block, factors assigned were the four concentrations of QL media (10, 20, 30 and 40%) with or without AgNp. Block restriction was done for experimental units (n) were the same in each block, as an assumption for Fisher multiple mean test. ANOVA and Fisher ($p \leq 0.05$) test were performed with Statistics (StatSoft Inc., 2004) and also, a principal component analysis (PCA) was run to explore and weighing the joint relations among variables.

Stage 2 (induction to multiple shoots) and stage 3 (rooting of shoots) were carried out with the best option media obtained from stage 1 (germination). Thus, at stages 2 and 3 treatments were analyzed as a complete randomized design. Data was contrasted with a non-parametric comparison of medians with the Wilcoxon matched pair test using Statistics (StatSoft Inc., 2004).

RESULTS AND DISCUSSION

Viability test and acorns disinfection

The X-ray analysis revealed that 75.5% of the acorns were healthy, 3.5% were infested by insects and 21% had some degree of separation between cotyledons, cotyledon-pericarps or both (Figure 1). The conditions reported for *Quercus* species by Goodman *et al.* (2005), and employed by Díaz-Fleischer *et al.* (2010), are 29 kV of power and 190 s; they were optimized to 17 s and 28 kV in our study. Such distinctions, according to Goodman *et al.*

(250 μ l L⁻¹), solidificados con 0.4% (p/v) de Phytigel™ y se agregaron 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA).

En esta etapa los factores a probar fueron las tres proporciones de hormonas BAP:ANA (1.0:0.1, 1.5:0.15 y 2.0:0.2 mg L⁻¹) y la presencia de CA (2 g L⁻¹). Los explantes se colocaron en el medio QL 30% enriquecido como se indicó en el párrafo anterior y con CA (por ser la mejor opción de medio en la etapa 1); y se mantuvieron con un fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad a 25 °C, y una humedad relativa de 80%. Las observaciones sobre el número, tamaño de brotes y grado de oxidación del medio, se registraron después de 120 d.

Enraizamiento de brotes

Los brotes se diseccionaron utilizando un bisturí en la campana de flujo laminar y se transfirieron a recipientes de cultivo con 40 mL de medio QL 40%, pH 5.7, 3% (p/v) de sacarosa, solidificados con 0.4% (p/v) Phytigel™ y adicionados con los reguladores de crecimiento ANA y BAP. Como en la etapa anterior, se probaron las tres proporciones de hormonas, ahora invertidas ANA:BAP (1.0:0.1, 1.5:0.15 y 2.0:0.2 mg L⁻¹) con CA (2 g L⁻¹). Los cultivos se mantuvieron en fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad a 25 °C y humedad relativa del 80%. Las observaciones sobre el porcentaje de enraizamiento se registraron después de 60 d.

Análisis estadístico

La investigación se realizó en tres etapas: germinación, inducción de brotes múltiples y enraizamiento de brotes. La primera etapa (germinación) en un arreglo factorial (4×2×2) se analizó en bloques completos aleatorizados, 16 tratamientos y cinco repeticiones, estratificando por el tercer factor: con o sin carbón activado (CA). Dentro de cada bloque CA, los factores alojados fueron las cuatro concentraciones del medio QL (10, 20, 30 y 40%) con y sin AgNp. La restricción por bloques se realizó para que las unidades experimentales (n) fueran las mismas en cada bloque, como requisito para la prueba de medias múltiples de Fisher. El ANDEVA y la prueba de Fisher ($p \leq 0.05$) se realizaron con el programa Statistics (StatSoft Inc., 2004) y, además, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para explorar y ponderar la relación conjunta entre las variables.

La etapa 2 (inducción de brotes múltiples) y la etapa 3 (enraizamiento de brotes) se realizaron solo con los medios que tuvieron la mejor respuesta en la etapa 1 (germinación). Por ello, en las etapas 2 y 3 los tratamientos se analizaron como un arreglo completamente aleatorizado. El contraste de los datos se hizo a través de una comparación no paramétrica de medianas con la prueba por pares de Wilcoxon en el programa Statistics (StatSoft Inc., 2004).

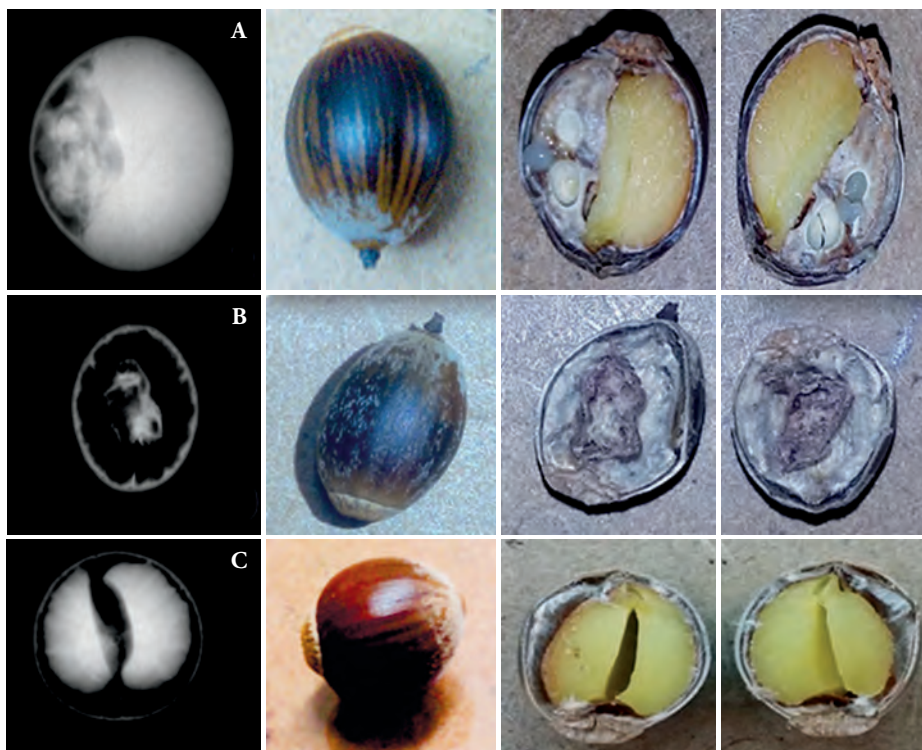


Figure 1. *Quercus sideroxyla* acorns with distinctive damages. A) Infested. B) Contracted embryo. C) Severe separation between cotyledons and pericarp.

Figura 1. Bellotas de *Quercus sideroxyla* con daños distintivos. A) Infestado. B) Embrión contraído. C) Separación severa entre cotiledones y pericarpio.

(2005), are associated with the recalcitrant nature of seeds, when they lose moisture and therefore viability. Regarding the percentage of infestation, Díaz-Fleischer *et al.* (2010) found 7% of insect-infested acorns in *Q. candidans* Née, while for the acorns collected in this study, infestation incidence was around 3%. The high percentage of healthy acorns for *Q. sideroxyla* could be favored by appropriate practices in the collection, since acorns were taken directly from the selected tree.

Influence of silver nanoparticles (AgNp) on contamination

Contamination (32.5%) was observed in the culture media to which no silver nanoparticles were added, and 15% in those where they were present, but there was no statistical difference ($p > 0.05$). Furthermore, by decreasing the confidence level to 93%, we can see that difference, which suggests that a dose greater than 25 mL L^{-1} of silver nanoparticles could be a factor and influence the response.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas de viabilidad y desinfección de bellotas

El análisis de rayos X mostró que 75.5% de las bellotas estaban sanas, 3.5% estaban infestadas por insectos y 21% tenían algún grado de separación entre los cotiledones, los cotiledones-pericarpios o ambos (Figura 1). Las condiciones indicadas por Goodman *et al.* (2005), para las especies de *Quercus* y seguidas por Díaz-Fleischer *et al.* (2010), son 29 kV de potencia y 190 s; en este estudio se optimizaron a 17 s y 28 kV. Tales características, de acuerdo con Goodman *et al.* (2005), se asocian con la naturaleza recalcitrante de las semillas, cuando pierden humedad y por lo tanto viabilidad. Respecto al porcentaje de infestación, Díaz-Fleischer *et al.* (2010) encontraron un 7% de bellotas infestadas por insectos en *Q. candidans* Née, mientras que en las bellotas recolectadas en este estudio, la incidencia de infestación fue de alrededor del 3%. El porcentaje

In vitro germination of *Q. sideroxylla*.

The concentration of the culture medium had a significant effect ($p \leq 0.05$) on the germination percentage of seeds. The best results were observed in the treatment with culture medium at 30% (QL 30%), where 70% of germinated explants were obtained. This treatment was not statistically different to the treatment QL 40%, which produced about 65% germination. Instead, media treatments QL 10% and QL 20%, showed 15 and 30% of germination, respectively, and there was no statistically significant difference between them (Figure 2).

In addition to germination, shoots, leaves, main and secondary roots were generated. The presence of activated carbon or AgNp ($p > 0.05$) did not influence germination. The same trend was observed for the main root formation, where the QL 30% proved to be the best treatment where 40% of the explants presented main root, but it was not different ($p > 0.05$) with respect to the QL 40% medium and its 35% response. The explants in (10 times) diluted medium showed only 5% of main roots, and no significant difference among treatments was found in QL 20% medium.

The presence of activated carbon influences the oxidation of acorns ($p \leq 0.05$). The 57.5% of samples showed oxidation in the treatments without activated carbon (Figure 3). Such oxidation was not observed

alto de bellotas saludables de *Q. sideroxylla* pudo favorecerse por las prácticas apropiadas en la colecta, ya que las bellotas se tomaron directamente del árbol seleccionado.

Influencia de las nanopartículas de plata (AgNp) sobre la contaminación

Contaminación en los medios de cultivo (32.5%) se observó en los recipientes a los cuales no se agregaron nanopartículas de plata y en 15% en aquellos donde AgNp estuvieron presentes, pero no hubo diferencia estadística ($p \leq 0.05$). Al disminuir el nivel de confianza al 93%, se pudo ver esa diferencia, lo cual sugiere que una dosis mayor a 25 mL L^{-1} de nanopartículas de plata podría ser un factor que influyera en la respuesta.

Germinación *in vitro* de *Q. sideroxylla*

La concentración del medio de cultivo tuvo un efecto significativo ($p \leq 0.05$) sobre el porcentaje de germinación de las semillas. Los mejores resultados se observaron en el tratamiento con medio de cultivo al 30% (QL 30%), donde se obtuvo el 70% de los explantes germinados. Este tratamiento no fue estadísticamente diferente al tratamiento QL 40%, que produjo aproximadamente el 65% de germinación. En cambio, los tratamientos

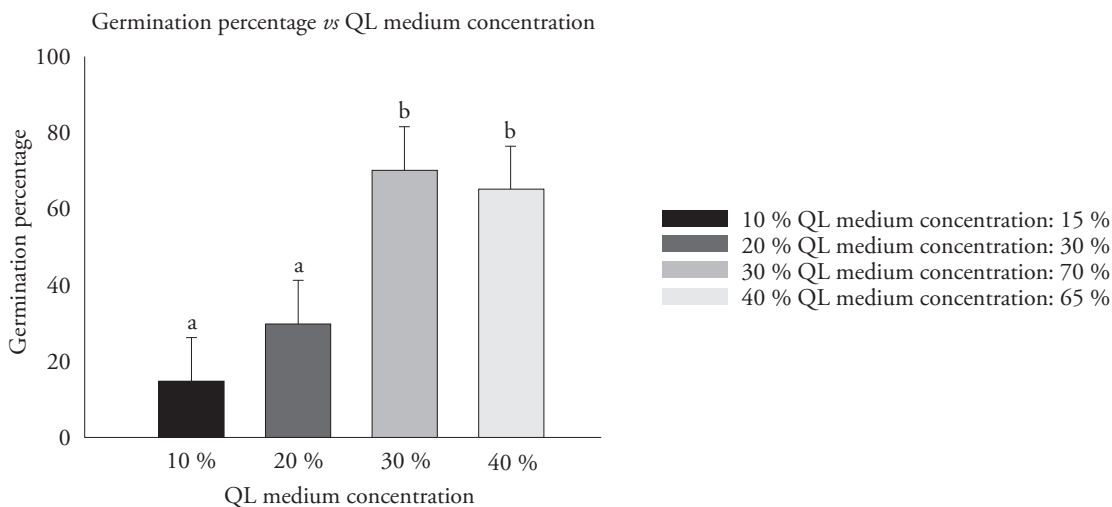


Figure 2. Germination percentage of *Q. sideroxylla* based on the medium concentration Quoirin & Lepoivre (QL).
^{a,b}Significant differences (ANOVA and Fisher test, $p \leq 0.05$).

Figura 2. Porcentaje de germinación de *Q. sideroxylla* basado en la concentración del medio Quoirin y Lepoivre (QL).
^{a,b}Diferencias significativas (ANDEVA y prueba de Fisher, $p \leq 0.05$).



Figure 3. Shoots, main and secondary roots at end of germination stage. A) QL medium with activated carbon. B) QL medium without activated carbon.

Figura 3. Brotes, raíces principales y secundarias al final de la etapa de germinación. A) Medio QL con carbón activado. B) Medio QL sin carbón activado.

in embryos containing activated carbon in their culture media.

Principal Component Analysis (PCA)

During the germination stage the presence of other structures was also observed, so it was decided to perform a principal component analysis to study the relationship between the variables. Principal component analysis revealed that the presence of main and secondary roots, number of secondary roots, radicular/root length (Figure 4), as well as presence, number, and size of shoots, when forming relative angles of less than 90° and being closer, are related to each other and with germination in a positive way. A total oxidation occurred, in which a negative relationship among germination and these variables was observed (when forming an angle smaller than 90° but far away). This confirmed the experimental results on the influence of total oxidation on germination, where none of the explants presenting such oxidation condition could germinate. Besides, explants, when forming an angle greater than 90° , they were not

QL 10% y QL 20% mostraron un 15 y 30% de germinación, respectivamente, y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Figura 2).

Además de la germinación, se generaron brotes, hojas, raíces principales y secundarias. La presencia de carbón activado o AgNp ($p \leq 0.05$) no influyó en la germinación. La misma tendencia se observó en la formación de la raíz principal, para la cual, el medio QL 30% demostró ser el mejor tratamiento al presentar raíz principal el 40% de los explantes, pero sin ser diferente ($p > 0.05$) con respecto al medio QL 40% (35% de explantes con raíz principal). Los explantes en el medio diluido (10 veces) mostraron solo el 5% de las raíces principales, y no se encontraron diferencias significativas en los tratamientos en el medio QL 20%.

La presencia de carbón activado influyó en la oxidación de las bellotas ($p \leq 0.05$). El 57.5% de las muestras mostró oxidación en los tratamientos sin carbón activado (Figura 3). Dicha oxidación no se observó en embriones que contenían carbón activado en sus medios de cultivo.

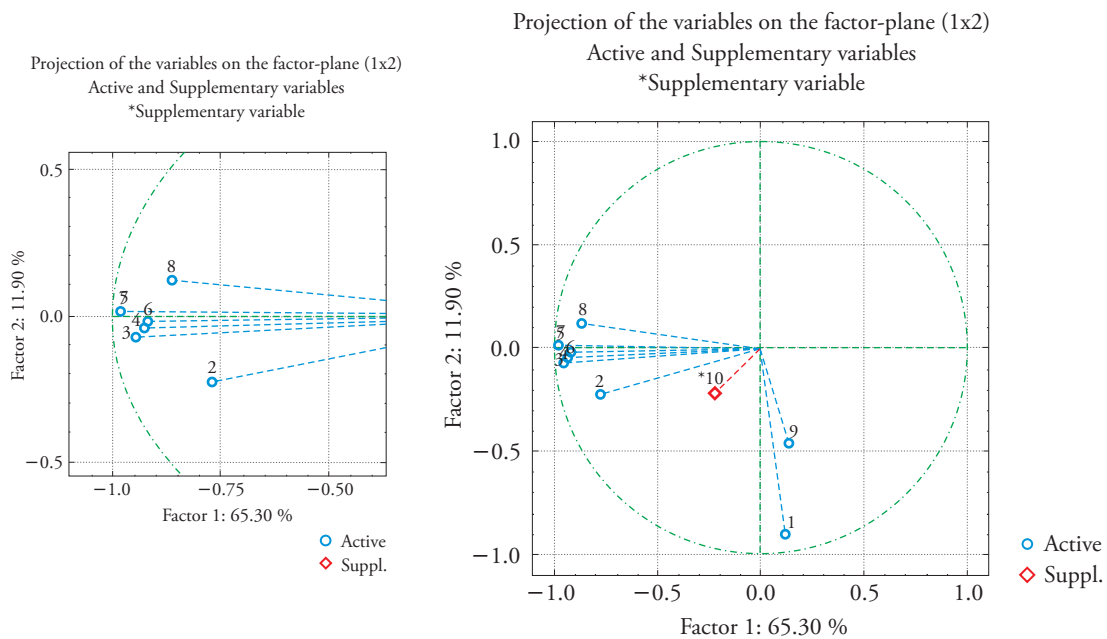


Figure 4. Principal component analysis. 1) explant; 2) germination; 3) shoot number; 4) shoot size; cm; 5) presence of main root; 6) radicle/main root length; 7) presence of secondary roots; 8) secondary roots; 9) contamination; 10) total oxidation.

Figura 4. Análisis de componentes principales. 1) explante; 2) germinación; 3) número de brotes; 4) tamaño del brote, cm; 5) presencia de la raíz principal; 6) longitud de la radícula/raíz principal; 7) presencia de raíces secundarias; 8) raíces secundarias; 9) contaminación; 10) oxidación total.

associated with these variables but with contamination. The latter indicated that the contamination was associated with the acorn employed.

Multiple shoots induction

The Wilcoxon matched pairs analysis revealed a significant statistical difference on the treatments with different concentrations of 6-benzylaminopurine and naphthalene acetic acid on number and size of shoots. Medians at the different BAP:NAA concentrations (1.0:0.1, 1.5:0.15 and 2.0:0.2 mg L⁻¹) were 3.5, 3 and 2 shoots, besides shoot lengths of 40, 25 and 25 mm, respectively. This means that, in the way in which this experiment was carried out, low BAP concentrations generate higher quantity and size of shoots (Figure 5). Although in this analysis is not possible to specify the groups that present significant statistical differences, the results are according with those reported for other *Quercus* species, where low concentrations of cytokines were favored by the induction of multiple shoots.

Our results are similar to those of Delgadillo-Díaz de León *et al.* (2013), who added 1 mg L⁻¹ of BAP for the induction of shoots and obtained an average of 3.6

Análisis de componentes principales (PCA)

Durante la etapa de germinación también se observó la presencia de otras estructuras, por lo tanto, se decidió realizar un análisis de componentes principales para estudiar la relación entre las variables. El análisis de componentes principales mostró que la presencia de raíces principales y secundarias, número de raíces secundarias, longitud de radícula y raíz (Figura 4), así como la presencia, el número y el tamaño de los brotes, cuando se agruparon más cercanos y en ángulos relativos menores a 90°, estuvieron relacionados entre sí y con la germinación de manera positiva. Una oxidación total se produjo y se observó una relación negativa entre la germinación y estas variables al formar un ángulo menor a 90°, pero más lejanas. Esto confirmó los resultados experimentales sobre la influencia de la oxidación total en la germinación; ninguno de los explantes que presentaron tal condición de oxidación pudo germinar. Además, los explantes ordenados en ángulo mayor de 90°, no se asociaron con las variables de respuesta sino con la contaminación. Esto último indicó que la contaminación dependió de la bellota empleada.

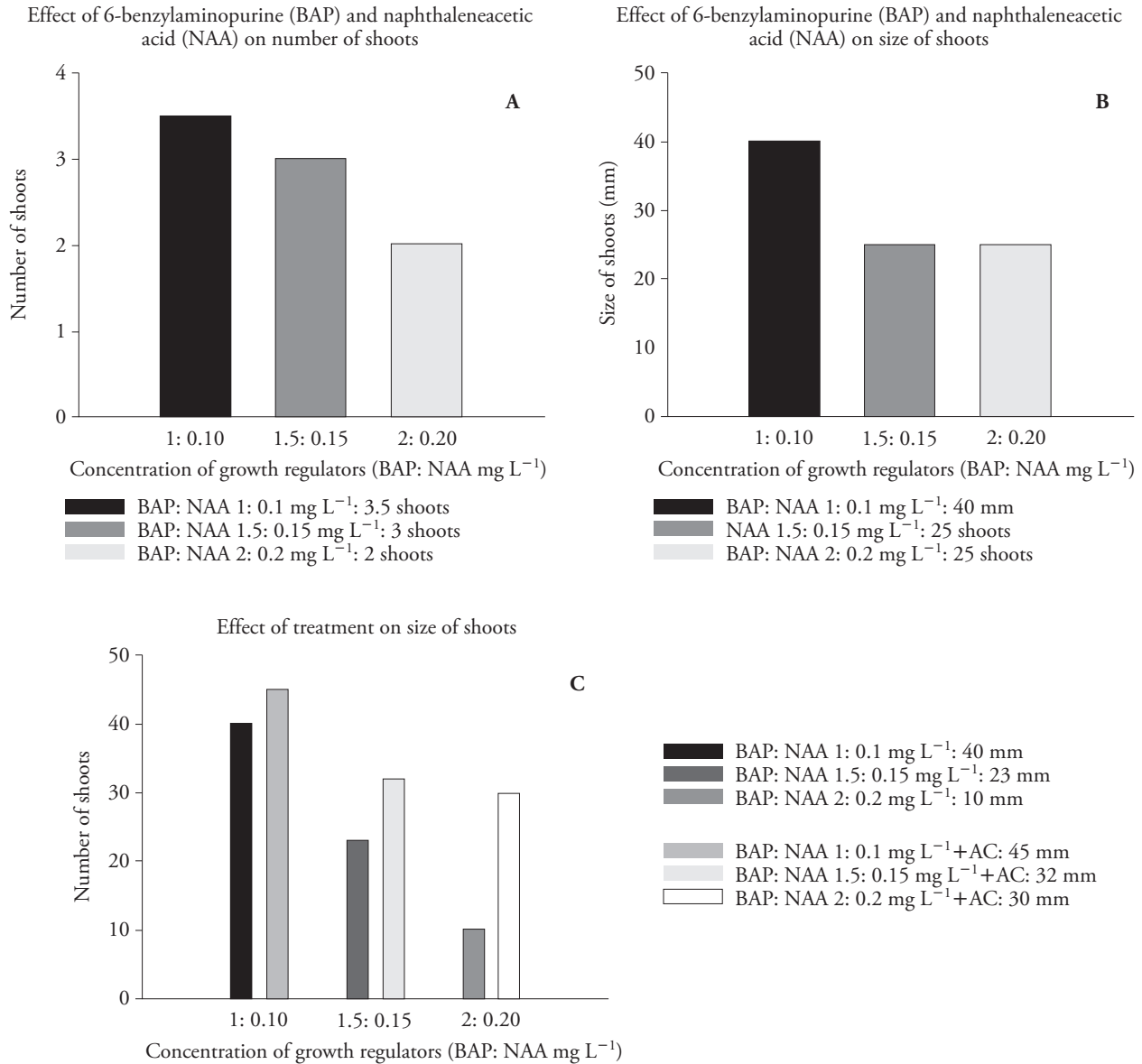


Figure 5. Sprouting stage. A) Effect of 6-benzylaminopurine (BAP) and naphthalene acetic acid (NAA) on the number of shoots. B) Effect of BAP and NAA on shoot size. C) Effect of treatment on the size of shoots. Wilcoxon matched analysis reveals significant statistical difference.

Figura 5. Etapa de germinación. A) Efecto de la 6-bencilaminopurina (BAP) y del ácido naftaleno acético (ANA) sobre el número de brotes. B) Efecto de BAP y ANA sobre el tamaño del brote. C) Efecto del tratamiento sobre el tamaño de los brotes. El análisis por pares de Wilcoxon indicó diferencia estadística significativa.

shoots and 37 mm of height for *Q. rugosa*; however, these values decreased at higher concentrations and when they applied 2 and 3 mg L⁻¹ of the hormone the results were 2.1 and 1.9 shoots and sizes of 32 and 30 mm, respectively. Additionally, Kartsonas and Papafotiou (2007) used culture media added with BAP and NAA and found 1.6 shoots and sizes of 21 mm for *Q. euboica*. Pandey and Tamta (2014) used

Inducción de brotes múltiples

El análisis de pares de Wilcoxon reveló una diferencia estadística significativa en los tratamientos con diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina y ácido naftalenoacético en el número y tamaño de los brotes. Las medianas en las concentraciones de BAP:ANA (1.0:0.1, 1.5:0.15 y 2.0:0.2 mg L⁻¹) fueron

BAP 4.44 mM (1 mg L⁻¹), 8.88 mM and 13.32 mM for *Q. serrata* and they obtained 3.22, 3.33 and 3.67 shoots per explant with sizes of 31, 23 and 20 mm, respectively. These numbers increased to an average of 5, 12 and 10 shoots, respectively, by adding 1.43 mM indole acetic acid (IAA). Besides, regarding the effect on the induction of shoots at 1 mg L⁻¹ BAP in embryos isolated from *Q. castanea*, *Q. eduardii* and *Q. resinosa*, Delgadillo-Díaz de León *et al.* (2013) obtained 2, 2.1 and 1.2 shoots, as well as sizes of 43, 42 and 65 mm, respectively.

In our experiment, even though the median was 3.5, 3 and 2 shoots, at the different concentrations of regulators, seedlings with 8, 6 and 5 shoots were found using 1.0:0.1, 1.5:0.15, and 2.0:0.2 mg L⁻¹ of BAP:NAA, respectively. In addition, 65% of the shoots had between 1 and 14 branches, which can be used as a potential source of explants in subsequent subcultures.

The shoot size medians obtained for the treatment BAP:NAA (1.0:0.1 mg L⁻¹) were 45 and 40 mm for media with and without AC, respectively. For the BAP:NAA (1.5:0.15 mg L⁻¹) treatment, shoot sizes of 32 and 23 mm were obtained in culture media with and without CA, respectively (Figure 6). Finally, for the BAP:NAA (2.0:0.2 mg L⁻¹) treatment, shoot size medians of 30 and 10 mm were found with and

3.5, 3 y 2 brotes, además de longitudes de brotes de 40, 25 y 25 mm, respectivamente. Esto significa que, en la forma en que se llevó a cabo este experimento, las concentraciones bajas de BAP generaron cantidad y tamaño mayores de brotes (Figura 5). Aunque en este análisis no fue posible especificar los grupos que presentaron diferencias estadísticamente significativas, los resultados coinciden con los informados para otras especies de *Quercus*, donde las concentraciones bajas de citoquinas favorecieron la inducción de brotes múltiples.

Nuestros resultados son similares a los de Delgadillo-Díaz de León *et al.* (2013), quienes agregaron 1 mg L⁻¹ de BAP para la inducción de brotes y obtuvieron un promedio de 3.6 brotes y 37 mm de altura para *Q. rugosa*; sin embargo, estos valores disminuyeron a concentraciones más altas y cuando aplicaron 2 y 3 mg L⁻¹ de la hormona, los resultados fueron 2.1 y 1.9 brotes con tamaños de 32 y 30 mm, respectivamente. Así mismo, Kartsonas y Papafotiou (2007) utilizaron medios de cultivo añadidos con BAP y ANA y encontraron 1.6 brotes y tamaño de 21 mm para *Q. euboica*. Pandey y Tamta (2014) utilizaron BAP 4.44 M (1 mg L⁻¹), 8.88 mM y 13.32 mM para *Q. serrata* y obtuvieron 3.22, 3.33 y 3.67 brotes por explante con medidas de 31, 23 y 20 mm, respectivamente. Estas cifras aumentaron a un promedio de 5, 12 y

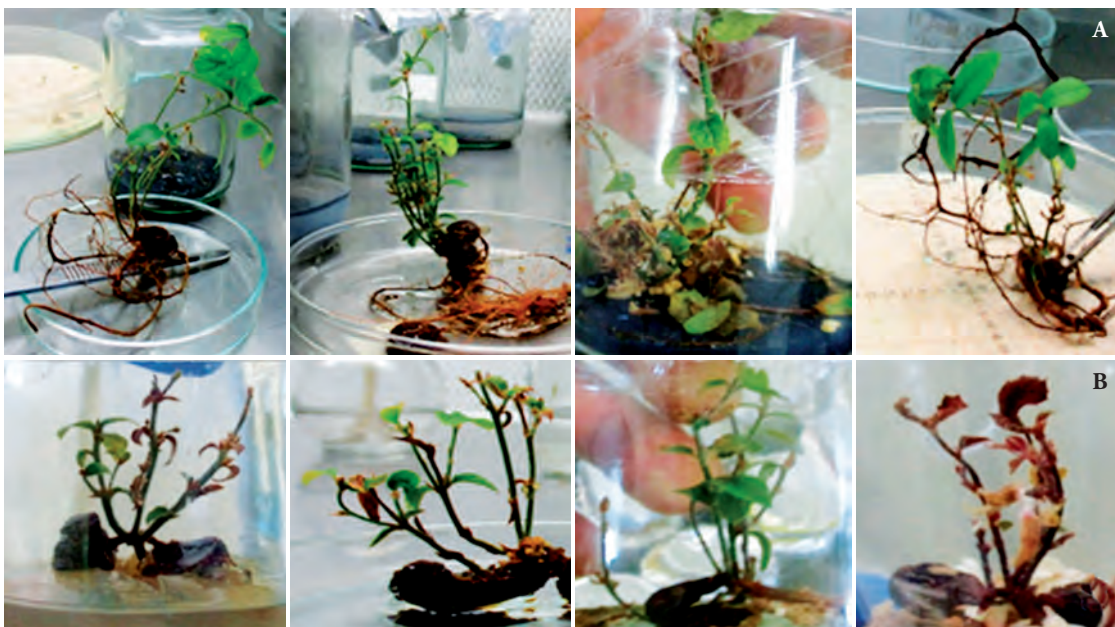


Figure 6. Shoots of *Quercus sideroxylla*. A) Treatment with activated carbon. B) Treatments without activated carbon.
Figura 6. Brotes de *Quercus sideroxylla*. A) Tratamiento con carbón activado. B) Tratamientos sin carbón activado.

without CA, respectively. The Wilcoxon matched pair test showed significant statistical differences among medians. According to Pintos *et al.* (2010), the activated carbon added to culture media had a positive effect on relative growth in *Quercus suber* explants. The differences found in our research, may be due to the role of the added growth promoter and cell development (Pan *et al.*, 2002), attributed to the adsorption by activated carbon of inhibitory substances such as phenolic compounds (Fridborg and Ericksson, 1978). Moreover, differences may be due to the growth inhibitory substances produced during sterilization, such as 5-hydroxymethyl-furaldehyde (Rao and Pattabiraman, 1990).

Rooting of shoots

Rooting percentages obtained for treatment NAA:BAP (1.0:0.1 mg L⁻¹) were 14.28 and 33.33% without and with AC respectively; for NAA:BAP (1.5:0.15 mg L⁻¹) they were 0 and 21.43% without and with AC respectively; and for NAA:BAP (2.0:0.2 mg L⁻¹) they were 20 and 80%, without and with AC respectively (Figure 7). In treatments with activated carbon in the medium, 6.25% of explants showed some degree of oxidation, and half of them were totally oxidized. Whilst in the treatments without activated carbon, partial oxidation was observed on 25% of the cases and in a total manner on 47% of them, which together represented 72% of affected oxidized explants.

10 brotes, respectivamente, al agregar 1.43 mM de ácido indolacético (AIA). Además, respecto al efecto sobre la inducción de brotes a 1 mg L⁻¹ de BAP en embriones aislados de *Q. castanea*, *Q. eduardii* y *Q. resinosa*, Delgadillo-Díaz de León *et al.* (2013) obtuvieron 2, 2.1 y 1.2 brotes, así como tamaños de 43, 42 y 65 mm, respectivamente.

En nuestro experimento, a pesar de que la mediana fue de 3.5, 3 y 2 brotes, en las diferentes concentraciones de reguladores, se encontraron plántulas con 8, 6 y 5 brotes al utilizar 1.0:0.1, 1.5:0.15 y 2.0:0.2 mg L⁻¹ de BAP:ANA, respectivamente. Además, el 65% de los brotes tuvieron entre 1 y 14 ramas, las cuales se pueden usar como una fuente potencial de explantes en subcultivos posteriores.

Las medianas de tamaño de brote obtenidas para el tratamiento BAP:ANA (1.0:0.1 mg L⁻¹) fueron de 45 y 40 mm en los medios con y sin CA, respectivamente. Con el tratamiento con BAP:ANA (1.5:0.15 mg L⁻¹), se obtuvieron tamaños de brotes de 32 y 23 mm en medios de cultivo con y sin CA, respectivamente (Figura 6). Finalmente, para el tratamiento BAP:ANA (2.0:0.2 mg L⁻¹), se encontraron medianas de 30 y 10 mm de tamaño de brote con y sin CA, respectivamente. La prueba por pares de Wilcoxon mostró diferencias estadísticamente significativas entre las medianas. Según Pintos *et al.* (2010), el carbón activado agregado a los medios de cultivo tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento relativo en los explantes de *Quercus suber*. Las diferencias encontradas en nuestra investigación pueden deberse a la función

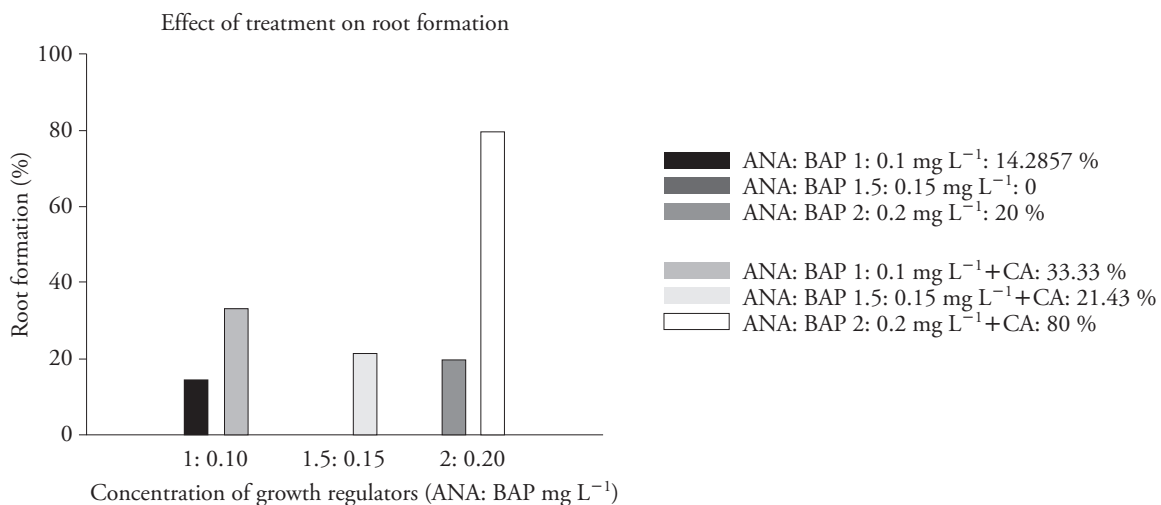


Figure 7. Treatment effect of 6-benzylaminopurine (BAP) and naphthalene acetic acid (NAA) on root formation.

Figura 7. Efecto del tratamiento de la 6-bencilaminopurina (BAP) y el ácido naftalenacético (ANA) sobre la formación de raíces.

Both growth regulators and activated carbon had a positive effect on rooting stage (Figure 8). With the NAA:BAP treatment ($1.0:0.1 \text{ mg L}^{-1}$), rooting percentage was 33.33%; with NAA:BAP ($1.5:0.15 \text{ mg L}^{-1}$) 21.43%; and with NAA:BAP ($2.0:0.2 \text{ mg L}^{-1}$) 80%, when adding AC. Statistical analysis using Wilcoxon matched pair test revealed significant statistical differences. Similar results were reported for micropropagation of *Q. rugosa*, *Q. eduardii*, *Q. castanea* and *Q. resinosa* using 1 mg L^{-1} of auxins such as Indole-3-butyric acid (IBA) (Delgadillo-Díaz de León *et al.*, 2013).

Influence of activated carbon on root oxidation

Activated carbon avoided the oxidation of explants, favoring the induction to rooting and root formation. Only 6.25% of explants showed partial oxidation and up to 50% were fully oxidized when activated carbon was used. When no activated carbon was added, a significant partial and full oxidation was detected. Significant statistical differences were observed according to the Wilcoxon matched pair test. These differences can be attributed to both the adsorption by activated carbon of inhibitory compounds, as well

del promotor del crecimiento añadido y al desarrollo celular (Pan *et al.*, 2002), atribuido a la adsorción por el carbón activado de sustancias inhibitoras como los compuestos fenólicos (Fridborg y Ericksson, 1978). Además, las diferencias pueden deberse a las sustancias inhibitoras del crecimiento producidas durante la esterilización, como el 5-hidroximetil-furaldehído (Rao y Pattabiraman, 1990).

Enraizamiento de brotes

Los porcentajes de enraizamiento obtenidos con el tratamiento ANA:BAP ($1.0:0.1 \text{ mg L}^{-1}$) fueron 14.28 y 33.33% sin y con CA respectivamente; para ANA:BAP ($1.5:0.15 \text{ mg L}^{-1}$) fueron 0 y 21.43% sin y con CA respectivamente; y para ANA:BAP ($2.0:0.2 \text{ mg L}^{-1}$) fueron 20 y 80%, sin y con CA respectivamente (Figura 7). En los tratamientos con carbón activado en el medio, el 6.25% de los explantes mostraron cierto grado de oxidación, y la mitad de ellos se oxidaron totalmente. Mientras que en los tratamientos sin carbón activado, se observó una oxidación parcial en el 25% de los casos y de forma total en el 47% de los mismos; en conjunto presentaron el 72% de los explantes oxidados afectados.

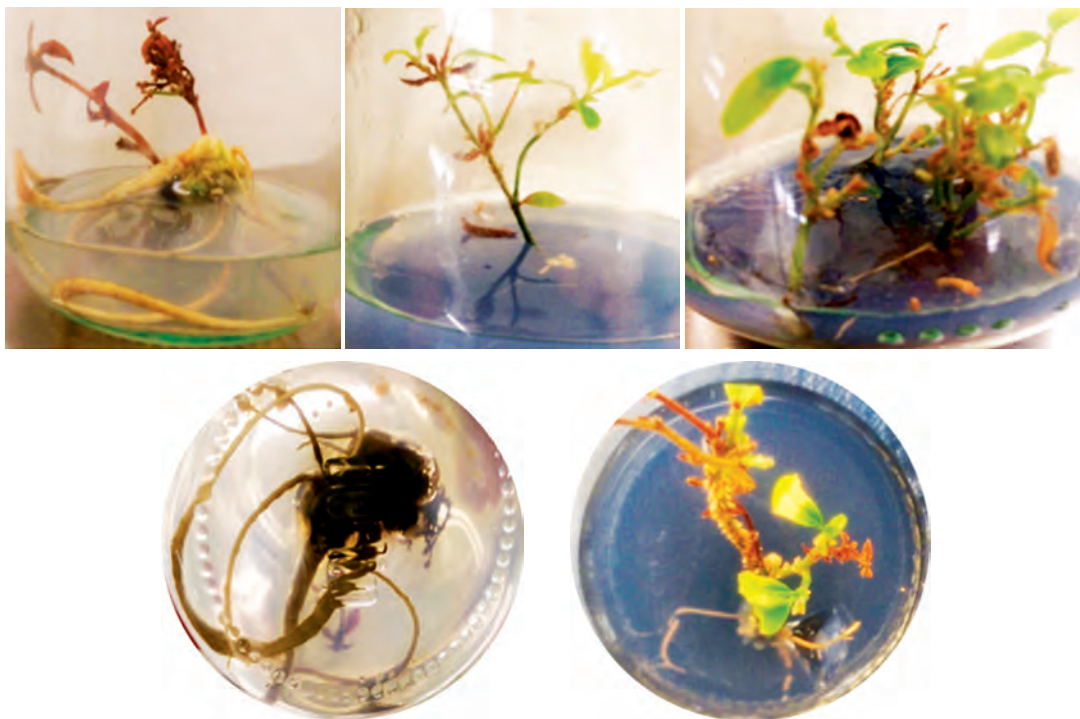


Figure 8. Root formation in explants of *Quercus sideroxylla*.

Figura 8. Formación de raíces en explantes de *Quercus sideroxylla*.

as to an accumulated environment of auxins and photosensitive cofactors evidenced by the browning at the base of the shoots (Nissen and Sutter, 1990). Activated carbon has promoted rhizogenesis in *Quercus rubur* and *Q. rubra* (Sanchez *et al.*, 1996), *Acacia leucophloea* (Sharma, Trivedi, and Purohit, 2012), *Daucus carota* (Pan *et al.*, 2002) and *Pinus pinaster* (Dumas and Monteuis, 1995).

Although the activated carbon did not have a direct relationship with germination (stage 1), it did with total or partial oxidation of the explant, which is finally related to germination. Those explants showing total oxidation failed to germinate, independently of the medium concentration used (Figure 9). The beneficial effect of activated carbon was attributed to its ability to remove inhibitory or toxic substances produced by the explant or during the sterilization of the medium (Fridborg and Ericksson, 1978; Ebert *et al.*, 1993; Petersen *et al.*, 1999).

CONCLUSIONS

The use of Quoirin - Lepoivre medium, activated carbon, silver nanoparticles, and growth regulators, provided the best results for explant germination of *Quercus sideroxyla* and their rooting.

In particular, the use of activated carbon as a bioactive-adsorbent material inhibited the oxidation

Tanto los reguladores del crecimiento como el carbón activado tuvieron un efecto positivo en la etapa de enraizamiento (Figura 8). Con el tratamiento ANA:BAP (1.0:0.1 mg L⁻¹), el porcentaje de enraizamiento fue de 33.33%; con ANA:BAP (1.5:0.15 mg L⁻¹) 21.43%; y con ANA:BAP (2.0:0.2 mg L⁻¹) 80%, cuando se agregó CA. El análisis estadístico de la prueba por pares de Wilcoxon indicó diferencias estadísticas significativas. Resultados similares se documentaron en la micropropagación de *Q. rugosa*, *Q. eduardii*, *Q. castanea* y *Q. resinosa* al utilizar 1 mg L⁻¹ de auxinas como el ácido indol-3-butírico (IBA) (Delgadillo-Díaz de León *et al.*, 2013).

Influencia del carbón activado en la oxidación de la raíz

El carbón activado inhibió la oxidación de los explantes, favoreció la inducción del enraizamiento y la formación de raíces. Solo el 6.25% de los explantes mostró oxidación parcial, y un máximo del 50% de ellos se oxidó completamente cuando se usó carbón activado. Cuando no se agregó carbón activado, se detectó una oxidación parcial significativa y completa. Diferencias estadísticas significativas se observaron de acuerdo con la prueba por pares de Wilcoxon. Estas diferencias pueden atribuirse tanto a la adsorción por el carbón activado de los compuestos inhibidores, como

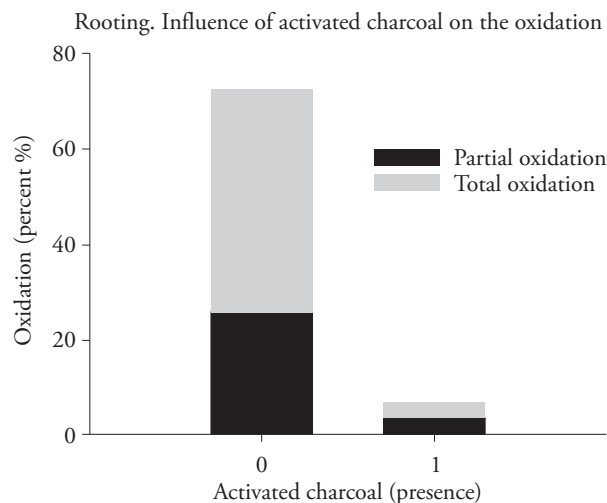


Figure 9. Influence of activated carbon on the oxidation during rooting. (The number 0 corresponds to treatment without activated carbon, and number 1 to the presence of activated carbon in treatment).

Figura 9. Influencia del carbón activado en la oxidación durante el enraizamiento. (El número 0 corresponde al tratamiento sin carbón activado, y el número 1 a la presencia de carbón activado en el tratamiento).

of *Q. sideroxylla* explants obtained from mature acorns. Activated carbon promoted growth in shoots of *Q. sideroxylla* and favored their rooting.

This is the first reported research on the successful micropropagation of this oak endemic species in Mexico.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors acknowledge Daniel Trujano Thomé, Manager of CONAFOR-Durango, for allowing the use of X-ray equipment. In particular, Oscar Domínguez Moreno for his invaluable assistance in performing the viability tests of acorns. Operative support and funds provided by Tecnológico Nacional de México (SEP-Mexican Government) and ISIMA-UJED are fully recognized.

LITERATURE CITED

- Arizaga, S., J. M. Cruz, M. S. Cabrales, and M. A. B. González. 2009. Manual de la Biodiversidad de Encinos Michoacanos. Instituto Nacional de Ecología. http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/consultaPublicacion.html?id_pub=603 (Access: January, 2017). 147 p.
- Bacon-Sobbe, J. R. 1997. Diagnóstico del Encino y su Industrialización en el estado de Durango, México: Parte 1: Problemática desde el punto de vista biológico. *In*: Colección Productos de Investigación Universitaria. Serie Ecológica Forestal Núm. 1. México: Universidad Juárez del Estado de Durango. 24 p.
- Chalupa, V. 1993. Vegetative propagation of oak (*Quercus robur* and *Q. petraea*) by cutting and tissue culture. *Ann. For. Sci.* 50 (Supplement): 295s-307s.
- CONAFOR. 2007. Más por los Bosques y las Selvas de México. Pro Árbol. México. 17 p.
- Delgadillo-Díaz de León, J. S., J. F. Morales-Domínguez, M. del S. Santos-Díaz, and E. Pérez-Molphe-Balch. 2013. In vitro propagation of Mexican oaks (*Quercus* spp.). *Polibotánica* 35: 85-97.
- Díaz-Fleischer, F., V. Hernández-Arellano, L. Sánchez-Velásquez, T. Cano-Medina, R. Cervantes-Alday, and M. López-Ortega. 2010. A preliminary investigation of the effect of pre-dispersal seed predation on the germination of *Quercus candicans* Née acorns. *Agrociencia* 44: 83-92.
- Díaz-Pontones, D., y I. Reyes-Jaramillo. 2009. Producción y almacenamiento de bellotas de *Quercus hintonii*, Warbug (Fagaceae) de la Depresión del Balsas, México. *Polibotánica* 27: 131-143.
- Dumas, E., and O. Monteuuis. 1995. *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 40: 231-235.
- Ebert, A., F. Taylor, and J. Blake. 1993. Changes of 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 33: 157-162.
- a un ambiente acumulado de auxinas y cofactores fotosensibles, lo cual evidenció el color pardo en la base de los brotes (Nissen y Sutter, 1990). El carbón activado ha promovido la rizogénesis en *Quercus rubur* y *Q. rubra* (Sánchez *et al.*, 1996), *Acacia leucophloea* (Sharma, Trivedi y Purohit, 2012), *Daucus carota* (Pan *et al.*, 2002) y *Pinus pinaster* (Dumas y Monteuuis, 1995).
- Aunque el carbón activado no tuvo una relación directa con la germinación (etapa 1), sí la tuvo con la oxidación total o parcial del explante, lo cual finalmente incide en la germinación. Aquellos explantes que mostraron oxidación total no germinaron, con independencia de la concentración de medio utilizada (Figura 9). El efecto benéfico del carbón activado se atribuyó a su capacidad para eliminar sustancias inhibitorias o tóxicas producidas por el explante o durante la esterilización del medio (Fridborg y Ericksson, 1978; Ebert *et al.*, 1993; Petersen *et al.*, 1999).

CONCLUSIONES

El uso del medio Quoirin-Lepoivre, el carbón activado, las nanopartículas de plata y los reguladores del crecimiento proporcionaron los resultados mejores para la germinación de explantes de *Quercus sideroxylla* y su enraizamiento.

En particular, el uso de carbón activado como material adsorbente de bioactivos inhibió la oxidación de los explantes de *Q. sideroxylla* obtenidos a partir de bellotas. El carbón activado promovió el crecimiento en los brotes de *Q. sideroxylla* y favoreció su enraizamiento.

Esta es la primera investigación documentada sobre la micropropagación exitosa de esta especie de encino endémico de México.

—Fin de la versión en Español—



Favre, J. M., and B. Juncker. 1987. *In vitro* growth of buds taken from seedlings and adult plant material in *Quercus robur* L. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 8: 49-60.

Fridborg G, M. Pedersen, L. E. Landstrom, and T. Ericksson. 1978. The effect of activated charcoal as an additive to the plant tissue cultures; absorption of metabolites inhibiting morphogenesis *Physiol. Plant* 43: 104-106.

Gómez-Mendoza, L., and L. Arriaga. 2007. Modeling the effect of climate change on the distribution of oak and pine species of Mexico. *Conservation Biol.* 21: 1545-1555.

- Goodman, R. C., D. F. Jacobs, and R. P. Karrfalt. 2005. Evaluating desiccation sensitivity of *Quercus rubra* acorns using X-ray image analysis. *Can. J. For. Res.* 28: 2823-2831.
- Gribko, L.S., T. M. Schuler, and W. M. Ford. 2002. Biotic and abiotic mechanisms in the establishment of northern red oak seedlings: a review. USDA Forest Service, 295, 18 p. http://www.fs.fed.us/ne/newtown_square/publications/technical_reports/pdfs/2002/gtrne295.pdf?origin=publication_detail (Access: January, 2017).
- Johnson, P. S., S. R. Shifle and R. Rogers. 2002. *The Ecology and Silviculture of Oaks*. New York, NY, USA: CABI. 53 p.
- Kartsonas, E., and M. Papafotiou. 2007. Mother plant age and seasonal influence on *in vitro* propagation of *Quercus euboica* Pap., an endemic, rare and endangered oak species of Greece. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 90: 111-116.
- Luna-José, A. de L., L. Montalvo Espinosa, and B. Rendón Aguilar. 2003. Los usos no leñosos de los encinos en México. *Bol. Soc. Bot. Méx.* (0366-2128): 107-117.
- Manzanera, J. A., and J. A. Pardos. 1990. Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 21: 1-8.
- Mas, J. F., A. Velázquez, J. R. Díaz-Gallegos, R. Mayorga-Saucedo, C. Alcántara, G. Bocco, R. Castro, T. Fernández, and A. Pérez-Vega. 2004. Assessing land use/cover changes: a nationwide multirate spatial database for Mexico. *Int. J. Appl. Earth Observ. Geoinfor.* 5: 249-261.
- Moreno-Jiménez, M. R., F. Trujillo-Esquivel, M.A. Gallegos-Corona, R. Reynoso-Camacho, R. F. González-Laredo, J. A. Gallegos-Infante, N. E. Rocha-Guzmán, and M. Ramos-Gómez. 2015. Antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic activities of edible red oak (*Quercus* spp.) infusions in rat colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine. *Food Chem. Toxicol.* 80: 144-153.
- Nájera-Luna, J. A., I. Rodríguez-Reta, J. Méndez-González, J. J. Graciano-Luna, F. Rosas-García, y F. Javier-Hernández. 2006. Evaluación de tres sistemas de asierre en *Quercus sideroxyla* Humb & Bompl. de el Salto, Durango. *Ra Ximhai* 2: 319-341.
- Nissen, S., and E. Sutter. 1990. Stability of IAA and IBA in nutrient medium to several tissue culture procedures. *Agron. Horticult. Faculty Publications* 25: 800-802.
- Pan, M., J. van Staden, and P. Debergh. 2002. The effect of activated charcoal and auxins on root formation by hypocotyl segments of *Daucus carota*. *South Afr. J. Bot.* 68: 349-356.
- Pandey, A., and S. Tamta. 2014. *In vitro* propagation of the important Tasar Oak (*Quercus serrata* Thunb.) by casein hydrolysate promoted high frequency shoot proliferation. *J. Sust. For.* 33: 590-603.
- Pérez-Olvera, C.P., R. Dávalos-Sotelo, y E. Guerrero-Cuacuil. 2000. Aprovechamiento de la madera de encino en México. *Madera y Bosques* 6: 3-13.
- Petersen, K. K., J. Hansen, and P. Krogstrup. 1999. Significance of different carbon sources and sterilization methods on callus induction and plant regeneration of *Miscanthus × ogiformis* Honda "Giganteus." *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 58: 189-197.
- Pintos, B., J. A. Manzanera, and M. A. Bueno. 2010. Oak somatic and gametic embryos maturation is affected by charcoal and specific aminoacids mixture. *Ann. For. Sci.* 67: 205.
- Purohit, V. K., L. M. S. Palni, S. K. N., and H. C. Rikhari. 2002a. *In vitro* regeneration of *Quercus floribunda* Lindl. Through cotyledonary nodes: an important tree of Central Himalaya. *Current Sci.* 83: 312-316.
- Purohit, V. K., S. Tamta, S. Chandra, P. Vyas, L. M. S. Palni, L., and S. K. Nandi. 2002b. *In vitro* multiplication of *Quercus leucotrichophora* and *Q. glauca*: Important Himalayan oaks. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 69: 121-133.
- Quoirin, M., and P. Lepoivre. 1977. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp. *Acta Horticulturae* 78: 437-442.
- Rao, P., and T. N. Pattabiraman. 1990. Further studies on the mechanism of phenol-sulfuric acid reaction with furaldehyde derivatives. *Analytical Biochem.* 189: 178-181.
- Reyes Jaramillo, I. 2006. *Quercus hintonii* Warb.: especie endémica del encinar del SW del Estado de México. *ContactoS* 5: 64-72.
- Rzedowski, J. 1998. *La Vegetación en México* (1st ed). D.F. México: Limusa. 502 p.
- Rzedowski, J. 2006. *Vegetación de México*. (C. N. para el C. y U. de la Biodiversidad, Ed.) (1a ed.). México: Editorial Limusa, S. A. <http://doi.org/10.2307/1219727>
- San-José, M. C., A. M. Vieitez, and A. Ballester. 1990. Clonal propagation of juvenile and adult trees of sessile oak by tissue culture techniques. *Plant Physiol.* 39: 50-55.
- Sanchez, M. C., M. C. San-Jose, A. Ballester, and A. M. Vieitez. 1996. Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. *Tree Physiol.* 16: 673-80.
- Schwarz, O. J., and S. E. Schlarbaum. 1993. Original article axillary bud proliferation of 2 North American oak species : *Quercus alba* and *Quercus rubra*. *Ann. Sci. For.* 50: 1-4.
- SEMARNAT. 2012. *Informe de la Situación del Medio Ambiente en México*. 2013. 385 p.
- Sharma, P. K., R. Trivedi, and S. D. Purohit. 2012. Activated charcoal improves rooting *in vitro*-derived *Acacia leucophloea* shoots. *Int. J. Plant Develop. Biol.* 6 (special issue 1): 47-50.
- StatSoft Inc. 2004. *Statistics for Window version 7.0*. Tulsa, Oklahoma, USA.
- Tamta, S., L. M. S. Palni, V. K. Purohit, and S. K. Nandi. 2008. *In vitro* propagation of brown oak (*Quercus semecarpifolia* Sm.) from seedling explants. *In Vitro Cellular Develop. Biol.* - *Plant* 44: 136-141.
- Vengadesan, G., and P. M. Pijut. 2009. *In vitro* propagation of northern red oak (*Quercus rubra* L.). *In Vitro Cellular Develop. Biol.* - *Plant* 45: 474-482.

