

TRABAJO CIENTÍFICO

Propagación *in vitro* de tres especies del género *Paulownia* bajo el sistema de propagación convencional

In vitro propagation of tree species of the *Paulownia* genus under the conventional propagation system

Ramos Veintimilla, R. A.¹; A. M. Cárdenas Rubio²; R. R. Vera Vélez³; J. R. Limongi Andrade⁴ y J. E. Grijalva Olmedo⁵

Recibido en marzo de 2017; aceptado en septiembre de 2017

RESUMEN

El propósito de la investigación consistió en evaluar un método de propagación mediante organogénesis directa, para facilitar el establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación de plantas de *Paulownia* con fines de propagación a gran escala. Este protocolo se evaluó en *Paulownia elongata*, *P. fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *elongata*) bajo el sistema convencional a partir de yemas. Se ejecutaron cuatro fases: (1) desinfección *in vitro*, tres protocolos de desinfección y dos medios de cultivo para introducción, (2) multiplicación *in vitro* con cuatro medios de cultivo para multiplicación, (3) enraizamiento *in vitro* con tres medios de cultivo semisólidos con base en diferentes dosis de hormonas auxinas y citoquininas, y (4) aclimatación, en la que se evaluaron dos sustratos. La desinfección más efectiva se logró mediante el protocolo compuesto por fungicidas/bactericidas + PVP + NaClO + ácido ascórbico + tween 20. Un alto índice de multiplicación (17 y 20 segmentos nodales) se logró con las tres dosis de hormonas evaluadas, en contraste al medio de cultivo M&S suplementado con 0,05 mg L⁻¹ de ANA+2 mg L⁻¹ de BAP, que presentó menos de 15 segmentos nodales. El mejor medio de cultivo para enraizamiento fue M&S suplementado con 0,4 mg L⁻¹ IBA durante 30 días. El sustrato compuesto por pomina y tierra negra (1:1) permitió un 100 % de supervivencia y una mayor altura de planta. En conclusión, la propagación *in vitro* bajo el sistema convencional podría ser utilizada para la multiplicación masiva de estas especies forestales.

Palabras clave: Multiplicación asexual; Fitohormonas; Medios de cultivo; Explantes; Desinfección; Aclimatación de plantines.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate an *in vitro* propagation method from buds of *Paulownia elongata*, *P. fortunei*, and the hybrid (*Paulownia fortunei* x *elongata*) through direct organogenesis in order to facilitate the establishment, propagation, rooting, and acclimatization of *Paulownia*'s seedlings for large-scale production purposes. Four phases were executed: (1) introduction and *in vitro* disinfection with three procedures and two culture medium types, (2) *in vitro* propagation with four culture media for multiplication, (3) *in vitro* rooting with three semisolid culture media based on different doses of auxins and cytokinines, and (4) acclimatization in which the response to 2 substrates under greenhouse conditions were evaluated. The most effective disinfection was achieved with the protocol involving fungicides/bactericides + PVP + hypochlorite sodium + ascorbic acid + tween 20. The highest propagation index (17 to 20 nodal segments) was achieved with the three hormones doses investigated; however, the M&S culture type supplemented by 0.05 mg L⁻¹ of ANA and 2 mg L⁻¹ of BAP, showed just 15 nodal segments. The most effective rooting method was M&S with 0.4 mg L⁻¹ IBA. The substrate composed of pomina and black soil (1:1) allowed 100 % of seedling survival and the highest plant height. In conclusion, *in vitro* propagation under the conventional system could be used for massive multiplication of these forest species.

Keywords: Asexual propagation; Phytohormones; Culture media; Explants; Disinfection; Seedling acclimatization.

¹ Escuela de Ingeniería Forestal, Facultad de Recursos Naturales, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Panamericana Sur km 1 ½. Riobamba, Ecuador. E-mail: raul.ramos@esPOCH.edu.ec

² Estación Experimental Santa Catalina, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Panamericana Sur km 1. Quito, Ecuador.

³ Department of Biology, 112 Science Place, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK S7N 5E2 – Canada.

⁴ Estación Experimental Portoviejo, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Km 12 Vía Santa Ana. Portoviejo, Ecuador.

⁵ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Jerónimo Leyton y Gato Sobral, Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador.

1. INTRODUCCIÓN

En Ecuador continental, tradicionalmente se explotan plantaciones con algunas especies forestales nativas e introducidas, principalmente balsa - *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb., pachaco - *Schizolobium parahyba* (Vell.) S.F. Blake, melina - *Gmelina arborea* Roxb., laurel - *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Cham., eucalipto - *Eucalyptus globulus* Labill., *E. urophylla* S.T. Blake X *E. grandis* W. Mill ex Maiden, *E. saligna* Sm. y pino - *Pinus radiata* D. Don, *P. patula* Schlttdl. & Cham.; sin embargo, el aprovechamiento intensivo de esas especies han provocado erosión de su reducida base genética, cuyos individuos sobresalientes se han tornado cada vez más escasos para cubrir la demanda interna y externa de madera de aserrío, industrial o energía de biomasa (MAE, 2010; MAGAP, 2013, Delgado y Játiva, 2010; Grijalva *et al.*, 2016; Limongi *et al.*, 2011; Lascano, 2008; Palacios *et al.*, 2011; Prado *et al.*, 2010). Lo expuesto, ha obligado a poner en agenda la necesidad de buscar nuevas especies forestales con atributos de crecimiento rápido, como potenciales alternativas para contribuir a las crecientes demandas forestales del país.

Paulownia es un género forestal perteneciente a la familia *Paulowniaceae* (García-Lahera, 2010). Nueve especies de este género son originarias de China, a excepción de *P. fortunei* (Seem.) Hemsl, que se extienden hasta Vietnam y Laos, mientras que *P. tomentosa* (Thunb.) Steud crece en Corea y Japón (Zhu *et al.*, 1986). De estas, las especies más utilizadas para proyectos forestales son *P. elongata* S. Y. Hu, *P. fortunei* y *P. kawakamii* T. Itô en razón de sus características de crecimiento rápido (Lucas *et al.*, 2010). En sitios adecuados, un árbol de diez años de edad puede alcanzar volúmenes aproximados de 4.0-4.5 m³, con crecimientos anuales en DAP de 3 a 4 cm (Zhu *et al.*, 1986; Lucas *et al.*, 2010). Tales atributos, a decir de varios autores, se manifiestan en la excelente calidad y belleza de su madera, su considerable producción de biomasa y capacidad de fijación de CO₂, potencial de aprovechamiento del follaje para el ganado, y también para programas de reforestación de tierras abandonadas y/o degradadas, además de sus atributos ornamentales (Wayne y Donald, 2004).

Paulownia se propaga normalmente por semilla que tiene un periodo de dormancia, característica que da lugar a una alta heterogeneidad en una plantación (Castellanos *et al.*, 2006) y a problemas en su manejo silvicultural (Bergmann y Moon, 1997). Para enfrentar esas limitantes, hoy en día se utiliza la propagación clonal que consiste en clonar plantas con características superiores para obtener rodales homogéneos y abastecer una producción forestal de mayor escala. Este tipo de multiplicación utiliza diversos tejidos con objetivos distintos, los segmentos foliares e internodales son utilizados como explantes para embriogénesis somática indirecta (Castillo *et al.*, 2012). Trabajos realizados con *P. elongata* han reportado promedios de 50.7 embriones somáticos (Ipekci y Gozukirmizi, 2003). Por otra parte, los tejidos más utilizados para la multiplicación clonal son los ápices o yemas axilares en especies tales como *P. catalpifolia* T. Gong ex D.Y. Hong (Song *et al.*, 1990), *P. tomentosa* (Rout *et al.*, 2001) y *P. fortunei* (Sharma *et al.*, 2003). Varios autores han demostrado la propagación in vitro de *P. tomentosa* mediante regeneración de brotes (Rao *et al.*, 1993) y la multiplicación masiva de *P. elongata* a través de cultivos nodales y brotes axilares (Bergmann y Whetten, 1998; Ipekci *et al.*, 2001; Lobna *et al.*, 2008).

Adicionalmente, es notable el éxito de la regeneración in vitro que ha permitido controlar algunos factores tales como: los antecedentes genéticos, tipos de tejidos y explantes, componentes nutricionales, condiciones ambientales, conservación de tejidos madre, reguladores de crecimiento (Ozaslan *et al.*, 2005). El género *Paulownia* se ha utilizado para evaluar sistemas de micropropagación, sin embargo no se reportan protocolos in vitro que permitan obtener altos índices de multiplicación clonal para producir plántulas aclimatadas y listas para ser establecidas en terreno. En el país, tampoco se reportan antecedentes de investigación con cultivo de tejidos aplicados al género *Paulownia* (Grijalva *et al.*, 2016), por cuya razón el propósito de esta investigación fue evaluar un método de propagación mediante organogénesis directa, para facilitar el establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación de plantas de *Paulownia*, con fines de propagación a gran escala.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio e invernadero del Departamento de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP, Ecuador.

Material vegetal

Cuarenta y cinco plantas jóvenes, de aproximadamente 30 cm de altura en promedio, de las especies *Paulownia elongata*, *P. fortunei*, y el híbrido (*P. elongata* x *P. fortunei*) fueron importadas del World Paulownia Institute (Instituto Mundial de la *Paulownia*) localizado en Georgia, Estados Unidos. Estas plantas fueron trasplantadas a fundas con una mezcla de tierra y turba (1:1) previamente esterilizada con Benlate 1g L⁻¹ de agua. En esta etapa de pre-adaptación permanecieron por 4 semanas bajo condiciones reguladas de temperatura (25±2 °C), humedad relativa (80 %) y manejo con riego (100 ml planta⁻¹ dos veces por semana) y controles fitosanitarios con Carbendazin en aplicaciones cada 8 días.

Preparación de explantes

Sesenta segmentos nodales, que consisten en yemas axilares y apicales de 1.5 a 3.0 cm de longitud, de las plantas de cada especie ($n=180$) fueron seleccionados, cortados y sumergidos en tres soluciones distintas. Una primera solución compuesta de agua con detergente para eliminar posibles contaminantes como polvo y corteza. La segunda solución compuesta de povidyn jabón, tween 20 y agua destilada en agitación por 10 minutos. La tercera solución con povidyn 1 % y agua destilada con agitación durante 10 minutos a 70 revoluciones por minuto (RPM). Finalmente, todo el material fue lavado con agua destilada estéril en agitación constante durante 10 minutos a 70 RPM.

Etapa de desinfección

La desinfección se basó en el procedimiento de Castillo *et al.* (2012), Ipekci *et al.*, (2001) y Ramírez *et al.*, (2001). Para ello, tres grupos de 20 explantes por cada especie del género *Paulownia* fueron separados. Cada grupo fue expuesto a los diferentes tratamientos de desinfección descritos en la tabla 1. Posteriormente, los desinfectantes fueron removidos de los segmentos nodales realizando tres enjuagues con agua destilada estéril. Adicionalmente, los medios de cultivo fueron elaborados según el procedimiento descrito por M&S (Murashige y Skoog, 1962). De los grupos previamente formados en el procedimiento de desinfección, los explantes fueron subdivididos en grupos de 10 por especie. Posteriormente fueron colocados en los dos tipos de medios de cultivo (Tabla 1) y almacenados por 4 semanas bajo condiciones controladas de temperatura (27 ±1 °C) y luminosidad (16 horas luz⁻¹ día⁻¹).

Etapa de multiplicación

Esta etapa consistió en evaluar el efecto de 4 medios de cultivo especializados para multiplicación sobre el desarrollo de los segmentos nodales desinfectados en la etapa anterior. Estos medios se basaron en diferentes dosis de hormonas ANA y BAP (Tabla 1) y fueron elaborados según el procedimiento descrito por (Murashige y Skoog, 1962). En cada medio de cultivo, se colocaron 10 explantes seleccionados de la etapa anterior y completamente libres de contaminantes. Finalmente, los tratamientos fueron almacenados por 4 semanas, bajo condiciones controladas (27 ±1 °C) y luminosidad (16 horas luz⁻¹ día⁻¹).

Tabla 1. Descripción de los tratamientos utilizados en la evaluación del protocolo para multiplicación in vitro de las tres especies del género *Paulownia* con fines de propagación a gran escala.

<i>Etapa de desinfección</i>	
Método de desinfección	
M1: Alcohol 70 % (v/v) + agitación 30s (70 rpm) + NaClO 1 % (v/v) 10 min	
M2: Alcohol 70 % (v/v) + agitación 60s (70 rpm) + NaClO 4 % (v/v) 2 min	
M3: Povidine 1 % + H ₂ O en agitación 10 min (70 rpm) + benomilo 1 g L ⁻¹ + CuSO ₄ · 5H ₂ O 1 % + Polivinilpirrolidona (PVP) 3 g L ⁻¹ + Rifampicina 0,50 mL L ⁻¹ en agitación 1h (70 rpm) + NaClO 1 % + ácido ascórbico 100 mg L ⁻¹ + tween 20 2 gotas 10 min.	
Medio de cultivo	
MC1: M&S + auxinas (ANA) 0,10 mg L ⁻¹ y citoquininas (BAP) 1 mg L ⁻¹	
MC2: M&S	
<i>Etapa de multiplicación</i>	
Medio de cultivo para multiplicación	
MC1: M&S + ANA (0 mg L ⁻¹) + BAP (0,20 mg L ⁻¹)	
MC2: M&S + ANA (0,05 mg L ⁻¹) + BAP (2 mg L ⁻¹)	
MC3: M&S + ANA (0,1 mg L ⁻¹) + BAP (1 mg L ⁻¹)	
MC4: M&S + ANA (0,20 mg L ⁻¹) + BAP (4 mg L ⁻¹)	
<i>Etapa de enraizamiento</i>	
Medio de cultivo para enraizamiento	
MC1: M&S + ANA (0,20 mg L ⁻¹) + IBA (0,4 mg L ⁻¹)	
MC2: M&S + IBA (0,4 mg L ⁻¹)	
MC3: M&S + IBA (1,5 mg L ⁻¹)	
<i>Etapa de aclimatación</i>	
Sustrato para vivero	
S1: turba 80 % + perlita 10 % + vermiculita 10 %	
S2: pomina 50 % y tierra negra 50 %	

Fase de enraizamiento

Esta etapa consistió en evaluar el efecto de tres medios de cultivo semisólidos, especializados para enraizamiento sobre el desarrollo de las raíces de segmentos nodales, seleccionados de la etapa de multiplicación. Estos medios fueron basados en diferentes dosis de hormonas IBA y ANA (Tabla 1) y fueron elaborados según los procedimientos descritos por Castillo *et al.*, (2012), Bergmann y Moon, (1997) y Castellanos *et al.*, (2006). En cada medio de cultivo, se colocaron 10 explantes seleccionados de la etapa anterior. Los tratamientos fueron almacenados por cuatro semanas bajo las mismas condiciones de temperatura y fotoperiodo.

Fase de aclimatación

Esta etapa consistió en evaluar el efecto de dos sustratos distintos sobre el establecimiento de plántulas de las tres especies del género *Paulownia* seleccionadas de la fase anterior, bajo condiciones de invernadero (Tabla 1). Ambos sustratos fueron esterilizados en autoclave en doble funda durante 30 minutos. Luego, fueron mezclados con agua destilada y finalmente, fueron colocados en macetas previamente desinfectadas con sablón diluido. Adicionalmente, las raíces de 10 plantas por cada especie, seleccionadas de la fase anterior, fueron lavadas con agua tibia estéril para retirar el residuo del medio de enraizamiento y posteriormente fueron colocadas en las macetas con cada sustrato. Las plantas fueron tapadas con un vaso plástico transparente con agujero en la parte superior, y permanecieron en el invernadero por 45 días. En esta fase se realizó riego dos veces por semana y se aplicó fertilizante complejo (11 % N, 5 % P, 5 % K, 0,04 % Cu, 0,04 % Mn y 0,04 % Zn) cada siete días utilizando en dosis de 1 g L⁻¹ de agua.

Registro de datos

Las variables evaluadas fueron agrupadas de acuerdo a las cuatro fases de investigación. En la primera etapa, la contaminación, oxidación, brotación y longitud del brote fueron registradas. Para la contaminación, la presencia o ausencia de micelio de hongos o colonias bacterianas en los explantes y en el medio de cultivo fue registrado a los 15 días. Se calificó con 0 la ausencia total de contaminación y con 1 la presencia de vitropatógenos. También se registró la oxidación en los explantes a los 15 días con 0 la ausencia y con 1 la presencia de oxidación. En brotación, la aparición de yemas fue registrada a los 30 días. Esta variable también fue representada como la ausencia o presencia en cada observación. La longitud del brote fue evaluada a los 30 días. El crecimiento de los brotes fue determinado mediante la medición desde la base del brote hasta el punto más alto de cada segmento nodal. En la segunda fase, la altura de los brotes y el número de segmentos nodales fueron registrados a los 30 días. La altura de los brotes fue medida en centímetros desde la base del tallo hasta la yema terminal, mientras que el número de nudos fue contabilizado. Para la tercera fase, la altura de los brotes, la longitud y el número de raíces fueron registrados a los 30 días. La longitud de raíces fue medida en centímetros desde la base del tallo hasta la terminación de la raíz, mientras que el número de raíces fue contabilizado. El procedimiento de medición de la altura de los brotes fue el mismo que la anterior fase. En la última fase, la longitud de la planta fue registrada a los 30 días, en la cual se siguió el mismo procedimiento de medición que las anteriores fases.

Análisis de los datos

El análisis estadístico se realizó por fases de investigación y tipo de variable. En variables de tipo binomial, tales como: brotación, contaminación y oxidación, un modelo lineal generalizado (MLG) fue aplicado con distribución binomial y función de enlace *logit*. La variable respuesta se identificó como número de explantes en brotación, contaminados y oxidados respectivamente. Dado que el número de observaciones por cada tratamiento fue de 10 (diez segmentos nodales), la respuesta pudo variar entre 0 y 10, se asumió que la respuesta en estas tres variables era independiente del contenedor (tubo de ensayo) utilizado, entonces la variable de respuesta sigue una distribución binomial con parámetros: π desconocido y $n=10$, por lo que las 10 observaciones fueron ingresadas en el análisis. Para aquellas variables que resultaron significativas en el MLG ($p<0,05$), se aplicó la prueba de diferenciación de medias DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002). Para las variables continuas: longitud del brote, número de raíces, longitud de raíces y número de nudos, un análisis de la varianza fue aplicado (ANOVA). A las variables que resultaron con significación estadística ($p<0,05$) se aplicó la prueba de diferenciación de medias de LSD de Fisher. Las variables número de raíces y número de nudos y longitud de brotes en la fase de enraizamiento, fueron transformadas con logaritmo natural para alcanzar homogeneidad de varianzas y normalidad en los residuos. El análisis se realizó en el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2016).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa de desinfección

El porcentaje de oxidación en los explantes varió entre 0 y 50 %. Los métodos de desinfección 2 y 3 fueron significativamente menores en porcentaje de oxidación en *P. fortunei* y el híbrido (*P. fortunei* x *P. elongata*), mientras que la respuesta fue similar entre los medios de cultivo con y sin hormonas (Fig. 1 a, b, c). Similares resultados fueron encontrados en el porcentaje de contaminación por vitropatógenos, donde los valores oscilaron entre 0 y 60 % con resultados significativos para las mismas dos especies. En esta variable, los menores valores fueron encontrados con el método de desinfección 3 compuesto por fungicidas/bactericidas

+PVP +NaClO +ácido ascórbico +tween 20 independientemente del contenido de hormonas en el medio de cultivo (Fig. 1 d, e, f). Por otra parte, el número de explantes con brotes varió entre 2 y 10, que representa del 20 al 100% de brotación, en donde los métodos de desinfección 3 y 1 fueron más efectivos en *P. fortunei*, mientras que las otras especies no experimentaron ningún efecto ni del método de desinfección ni del medio de cultivo (Fig. 1 g, h, i). Finalmente, la longitud del brote varió con los tratamientos, particularmente en *P. fortunei* cuyos mayores valores fueron encontrados en el medio de cultivo con hormonas auxinas (ANA) y citoquininas (BAP) y los métodos de desinfección 1 y 3 (Fig. 1 j). En *P. elongata* y el híbrido (*P. fortunei* x *P. elongata*) la mayor longitud de brote fue observada en el medio de cultivo con hormonas, pero difirieron con el método de desinfección, presentando mayores valores en el método 3 para la primera especie y el método 2 para la segunda (Fig. 1 k, l). Estos resultados pueden deberse a una acción combinada de fungicidas y bactericidas derivados de cobre que actúan como iones cúpricos, inhibiendo una gran variedad de enzimas, provocando la coagulación del protoplasma celular y causan la muerte de la espora del hongo (Espina y Vanegas, 2005). Trabajos relacionados con especies forestales como *Salix* sp. L. y *Aniba perutilis* Hemsl., han comprobado que el empleo de una mezcla de fungicidas (Benlate-Captam) y NaOCl al 10 % por 30 y 20 minutos permiten mantener niveles de asepsia mayores al 70 % (Chung y Carrasco, 2002). Por otra parte, Ramírez *et al.*, (2001) señalan que la micropropagación de leñosas en Woody Plant Medium (WPM) al 100 % complementado con vitaminas + 1 mg L⁻¹ de BAP + 0,50 mg L⁻¹ de ANA, se obtiene un 70 % de brotación, mientras que en el presente estudio con la utilización de M&S al 100 % complementado con vitaminas sin reguladores de crecimiento, se obtuvo el 100 % de brotación de yemas, lo que sugiere un efecto significativo del medio base sobre los niveles de brotación de las especies en cuestión y posiblemente una mayor eficiencia productiva de plántulas. Adicionalmente, en tratamientos con 0,10 mg L⁻¹ ANA y 1 mg L⁻¹ BAP se observó la formación de callo embrionario. Similares resultados fueron reportados por Ipekci *et al.*, (2001) en *P. elongata* utilizando M&S + 4 mg L⁻¹ de BAP y 0,20 mg L⁻¹ de ANA, lo que sugiere un efecto combinado de ambas hormonas como sistema útil para regeneración por embriogénesis y organogénesis indirecta. En tanto que para *P. fortunei*, las recomendaciones se han centrado en la utilización de M&S + 1 mg L⁻¹ de BAP (Yenkateswarlu *et al.*, 2001).

Etapa de multiplicación

Los resultados de las dosis de hormonas BAP y ANA a los 30 días de cultivo de explantes mostraron una mayor respuesta en la altura de brotes que sobre el número de segmentos nodales. En el caso de los segmentos nodales, el único efecto significativo fue observado en *P. fortunei* en M&S suplementado con 0,05 mg L⁻¹ de ANA+2 mg L⁻¹ de BAP, que mostró valores por debajo de 15 segmentos nodales planta⁻¹, en comparación con las otras tres dosis de hormonas que presentaron entre 17 y 20 (prueba LDS de Fisher p<0,05). Las otras dos especies *P. fortunei* y *P. fortunei* x *elongata* se destacaron presentando entre 22 y 27 segmentos nodales planta⁻¹, pero sin mostrar diferencias significativas. La altura de brotes de cada especie varía con los diferentes medios de cultivo para multiplicación entre 3 y 8 cm aproximadamente (Figura 2). Las tres especies presentan los mayores valores con el método de multiplicación 1 (BAP 0,20 mg L⁻¹), aunque *P. fortunei* es significativamente menor en comparación con las otras dos especies. También se observa un decrecimiento de las micro-plantas al adicionar pequeñas dosis de ANA, aunque parece recuperarse al aumentar la dosificación de ANA y BAP, particularmente *P. elongata*. Esto sugiere que las hormonas de tipo auxinas afectan el desarrollo de brotes en la etapa de multiplicación independientemente del tipo de especies, al menos que las dosis sean en cantidades superiores a 0,1 mg L⁻¹ (Medio de cultivo para multiplicación 3). Estos resultados sugieren la utilización de bajas concentraciones de citocinina (BAP) y auxinas (ANA) para promover la proliferación y elongación de brotes; lo que difiere de Zayova, (2011) quién utilizó cantidades mayores hormonas para obtener similares resultados. Esto probablemente se deba a que pequeñas cantidades de hormona BAP son sintetizadas por brotes activos de las plántulas, pero es insuficiente para inducir el crecimiento y desarrollo *in vitro* de los brotes y yemas. Por esta razón, más del 85 % de los medios de cultivo empleados en la

micropropagación incluyen algún suplemento de citocinina, por ejemplo, Pérez, (1998) adicionalmente encontró presencia de callos en la base de las plántulas, lo que muestra posibilidades de regeneración por embriogénesis y organogénesis indirecta tal como lo mencionan Castillo *et al.*, (2012) y Ipekci *et al.*, (2001).

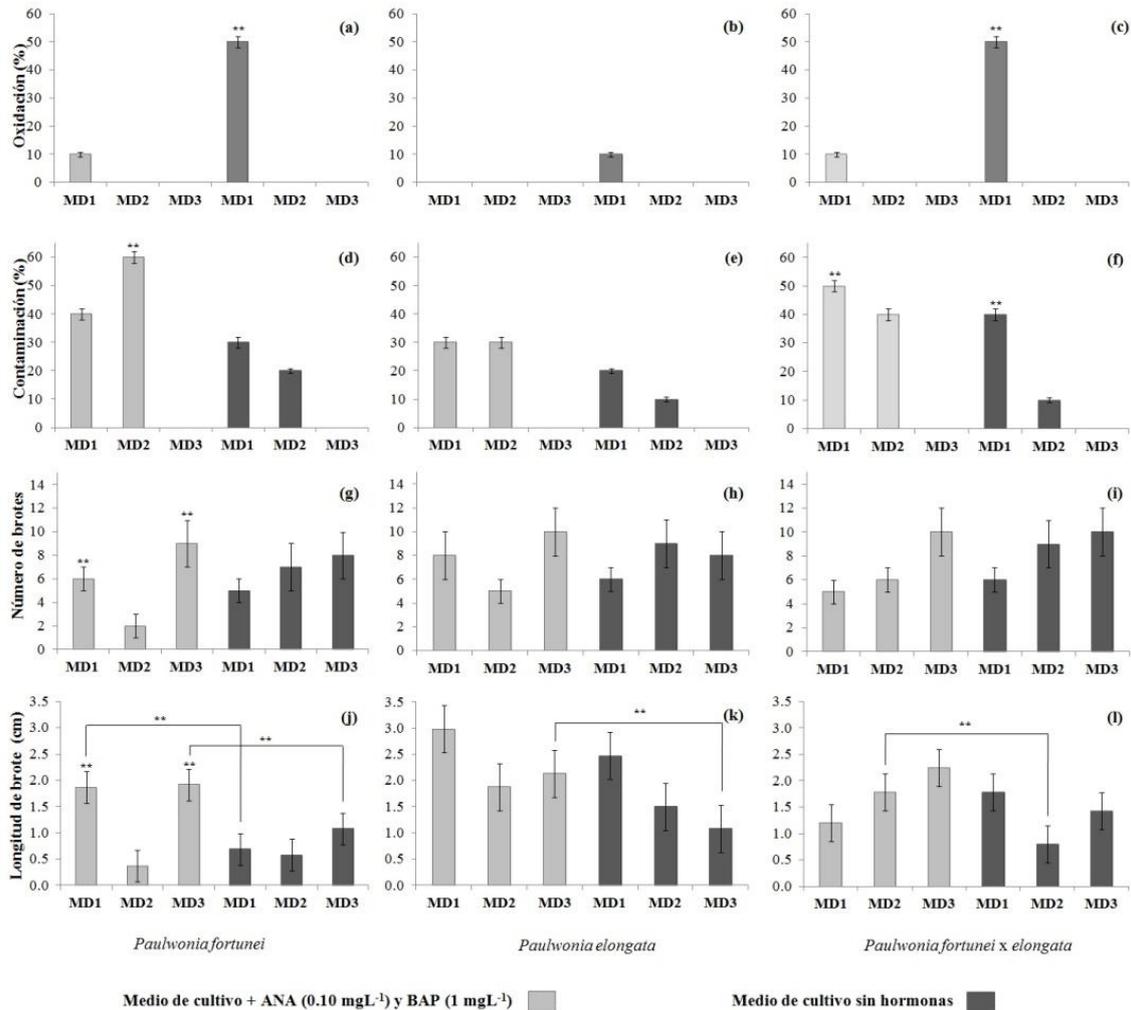


Figura 1. Porcentaje de oxidación, contaminación, número de brotes y longitud promedio de brotes (\pm error estándar) por especies, métodos de desinfección y medios de cultivo. Las especies están representadas en columnas y variables en filas. Los medios de cultivo se distinguen por colores gris oscuro (sin hormonas) y gris claro (con hormonas) y los métodos de desinfección como MD1 al MD3. Los asteriscos sobre las barras identifican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los métodos de desinfección, mientras que los asteriscos ubicados sobre las líneas muestran diferencias ($p < 0,05$) entre medios de cultivo.

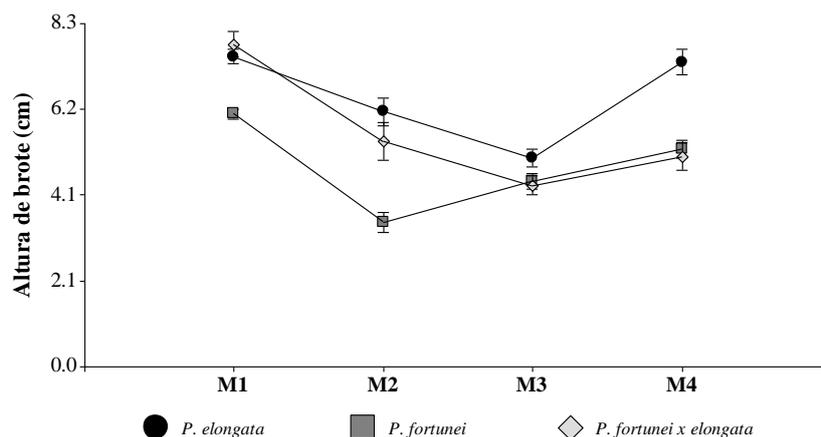


Figura 2. Gráfica que muestra el efecto de la interacción entre los 4 métodos de multiplicación y las tres especies del género *Paulownia* analizadas sobre la altura de los brotes. La escala de grises y los símbolos describen a las especies. La variable altura de brote fue transformada utilizando logaritmo natural para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, sin embargo, en esta gráfica se presentan los valores originales para mayor comprensión.

Etapa de enraizamiento

El efecto de la aplicación de hormonas ANA e IBA en el enraizamiento de micro-plantas de *Paulownia* indicaron diferencias altamente significativas. En *P. fortunei*, el medio 3 compuesto por M&S + 1,5 mg L⁻¹ IBA presentó mayor número de raíces (de 6 a 7) y longitud de brote (3,7 cm), y la mayor longitud de la raíz se presentó con el medio 1 (M&S+0,20 mg L⁻¹ ANA+ 0,4 mg L⁻¹ IBA) con 5,20 cm. El híbrido *P. fortunei x elongata* mostró similar respuesta a diferentes medios. Es así que al mayor número de raíces y longitud de las mismas se presentó con el medio de cultivo 3, y la mayor longitud de brote (3,45 cm) con el medio de cultivo 1 (M&S+0,20 mg L⁻¹ ANA+ 0,4 mg L⁻¹ IBA). Por el contrario, *P. elongata* mostró una respuesta consistente al medio de cultivo 1 para las tres variables de crecimiento. Bergmann y Moon, (1997) mostraron resultados similares en *P. elongata* utilizando segmentos foliares de plántulas establecidas *in vitro* con las mismas hormonas. Chinchilla, (2008) y Ordóñez, (2013) mencionan que las respuestas fisiológicas son desencadenadas por la presencia de auxinas, además afirman que IBA en bajas concentraciones favorece el crecimiento primario de la planta y estimulan los procesos de multiplicación celular. Por su parte, Sunseri, (2001) señala que la respuesta fisiológica de elongación celular depende de la interacción de hormonas auxinas añadidas en el medio con las sintetizadas por la propia planta, generando en ocasiones respuestas opuestas a la esperada, a los que nuestro estudio sugiere además que el efecto de las hormonas ANA e IBA tienen un efecto especializado en distintos órganos de la planta en función de las dosis aplicadas.

Etapa de aclimatación

Los resultados en esta etapa mostraron un 100 % de supervivencia en todos los tratamientos y en las tres especies de *Paulownia*. Adicionalmente, el efecto en altura de planta a los 45 días de evaluación en los dos tipos de sustratos, indican diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) únicamente en *P. elongata*, mostrando mayor altura de planta en individuos colocados en el sustrato pomina 50 % y tierra negra 50 % (>11 cm) y los individuos plantados en sustrato compuesto por turba 80 % + perlita 10 % y 10 % de vermiculita presentaron una altura de planta menor a 9 cm. En el caso de *P. fortunei* y en el híbrido (*P. fortunei x elongata*) las plantas presentaron un desarrollo similar independientemente del sustrato utilizado. Esto sugiere que las características físicas de la turba, tales como alta porosidad combinados con retención de humedad pudieron haber ejercido un efecto positivo sobre la capacidad receptora

de nutrientes en las plantas y aireación de las raíces en *P. elongata*, evitando así los niveles de deshidratación y promoviendo el desarrollo en altura de planta, tallo más grueso, hojas anchas, entre otras. Estos resultados mostraron mayor eficiencia en supervivencia y crecimiento de plantas a lo señalado por Clapa *et al.*, (2014), Ipekci y Gozukirmizi, (2003) y Lobna *et al.*, (2008), quienes presentaron menor supervivencia de plantas y menor crecimiento en *P. elongata* y *P. kawakami* respectivamente con sustratos más porosos. Por lo que el presente estudio sugiere un proceso más eficiente para aclimatación de plantas in vitro.

Tabla 2. Promedio de número de raíces, longitud de raíces (cm) y longitud de brote (cm) (\pm error estándar) por especies y medio de cultivo de enraizamiento. Los datos de las tres variables fueron transformados con Ln para alcanzar homogeneidad de varianzas, pero para mayor comprensión de los resultados, los valores originales fueron incorporados en esta tabla. Diferentes letras en minúscula muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tres métodos de enraizamiento. Los datos en negrilla resaltan los valores más altos alcanzados en cada variable por cada especie.

<i>Paulownia fortunei</i>	MC1		MC2		MC3	
# raíces	5,60 \pm 0,25	b	5,40 \pm 0,25	b	6,80 \pm0,25	a
Long raíces cm	5,20 \pm0,17	a	2,60 \pm 0,17	b	2,75 \pm 0,17	b
Long. brote cm	3,77 \pm0,12	a	3,30 \pm 0,12	b	3,75 \pm0,12	a
<i>Paulownia elongata</i>						
# raíces	6,20 \pm0,25	a	6,70 \pm0,25	a	2,70 \pm 0,25	b
Long raíces cm	6,90 \pm0,17	a	4,35 \pm 0,17	c	5,40 \pm 0,17	b
Long. brote cm	5,05 \pm0,12	a	4,31 \pm 0,12	b	3,96 \pm 0,12	c
<i>P. fortunei x elongata</i>						
# raíces	3,40 \pm 0,25	c	4,90 \pm 0,25	b	9,30 \pm0,25	a
Long raíces cm	2,20 \pm 0,17	b	2,20 \pm 0,17	b	3,22 \pm0,17	a
Long. brote cm	3,45 \pm0,12	a	2,20 \pm 0,12	b	2,50 \pm 0,12	b

4. CONCLUSIONES

El material vegetal de las tres especies del género *Paulownia* es resistente a la exposición de elementos químicos como el alcohol y el hipoclorito de sodio, lo que permite su desinfección previa al proceso de multiplicación. Sin embargo, la aplicación de fungicidas y bactericidas más el uso de hormonas auxinas y citoquininas son necesarios para asegurar niveles bajos de contaminación por vitropatógenos, sobre todo en *P. elongata* y el híbrido *P. fortunei x elongata*, y para fomentar un rápido desarrollo vegetativo de las plántulas en el arranque del proceso de propagación. En la etapa de multiplicación, el desarrollo vegetativo de las plántulas es favorecido por el uso de bajas dosis de hormonas BAP, particularmente la altura de los brotes. Aunque un estudio con dosis superiores a 0,1 mg L⁻¹ de hormonas ANA podría resultar en un método que potencie el desarrollo de los brotes en esta etapa. Adicionalmente, la aplicación de hormonas tipo IBA y ANA ejercen un efecto especializado en el desarrollo radicular y vegetativo de plántulas en función de las dosis aplicadas y la especie en cuestión. Es así que un incremento en las dosis de hormonas IBA favorece el desarrollo en número y tamaño de raíces, mientras que valores bajos favorecen el desarrollo de brotes en el híbrido *P. fortunei x elongata* y en *P. fortunei*. Sin embargo, *P. elongata* es favorecida únicamente por valores bajos de hormona tipo IBA para su estructura radicular y vegetativa en la etapa de enraizamiento. Finalmente, para asegurar un alto rendimiento en término de plantas vivas y crecimiento en altura de planta, en la etapa de aclimatación, el uso de sustratos que proporcionen al menos un

50 % de porosidad son necesarios para asegurar suficiente drenaje, y el otro 50 % con sustratos que contengan elementos nutricionales que puedan ser aprovechados por la planta en esta etapa; aunque esto último aún debe ser estudiado a mayor profundidad.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bergmann, B. A.; R. Whetten. 1998. In vitro rooting and early greenhouse growth of micropropagated *Paulownia elongata* shoots. *New Forests* 15(2):127-138
- Bergmann, B. A.; H. K. Moon. 1997. In vitro adventitious shoot production in Paulownia. *Plant Cell Reports* 16: 315-317
- Castellanos, O.; A. Rodríguez; J. Rodríguez; B. Rodríguez. 2006. Organogénesis indirecta y enraizamiento “in vitro” de “*Paulownia elongata*”. *Redalyc* 4(15):1-12
- Castillo, C.; A. Gutiérrez; M. Buenrostro; V. Cadena; J. Cetina. 2012. Regeneración de plantas de *Paulownia elongata* Steud. por organogénesis directa. *Revista Mexicana Científica* 3(10):41-49
- Chinchilla, S. I. 2008. *Establecimiento y cultivo in vitro de Pouteria sapota (Jacquin) HE Moore & Stearn*. Trabajo final de graduación. Universidad de Costa Rica
- Chung, P.; Carrasco, B. 2002. Micropropagación de Salix spp a través de meristemas foliares. *Ciencia e Investigación Forestal-Instituto Forestal/Chile* 12:63-77
- Clapa, D.; Al. Fira; S. Manuela; L. Vasu; D. Buduroi. 2014. Improved In Vitro Propagation of *Paulownia elongata*, *P. fortunei* and its Interspecific Hybrid *P. elongata* x *P. fortunei*. *Bulletin UASVM Horticulture* 71(1):6-14
- Delgado, J.; P. Játiva. 2010. *Políticas institucionales de Investigación, Transferencia de Innovaciones y Prestación de Servicios Tecnológicos*. INIAP, Quito. 52 p.
- Di Rienzo, J. A.; A. W. Guzmán; F. Casanoves. 2002. A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics* 7(2):129-142
- Di Rienzo J. A.; F. Casanoves; M. G. Balzarini; L. Gonzalez; M. Tablada; C.W. Robledo. *InfoStat versión 2016*. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <<http://www.infostat.com.ar>>
- Espina, S.; C. Vanegas. 2005. Ecofisiología y contaminación. En: *Golfo de México: Contaminación e Impacto ambiental: Diagnóstico y Tendencias*, 2da Edición 2005, p. 53-78. Botello, A.; J. Rendón; G. Gold-Bouchot; C. Agraz-Hernández (Eds). Universidad Autónoma de Campeche. México
- Grijalva, J.; X. Checa; R. Ramos; P. Barrera; R. Vera; F. Sigcha. 2016. *Estado de los recursos genéticos forestales en Ecuador. Programa Nacional de forestería del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias*. INIAP, Quito. 100 p.
- Ipekci, Z.; A. Atinkut; K. Kazan; K. Bajrovic; N. Gozukirmizi. 2001. High frequency plant regeneration from nodal explants of *Paulownia elongata*. *Plant Biol* 3(2):113-115
- Ipekci, Z.; N. Gozukirmizi. 2003. Direct Somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. *Plant Cell Rep* 22(1):16-24
- García-Lahera, J. P. 2010. *Guía de facilitación para el trabajo con la literatura de referencia sobre la flora de Cuba*. Editorial Feijóo, Cuba
- Lascano, M. 2008. *Valoración de la contribución forestal a la economía nacional, caso Ecuador*. OTCA. Ecuador
- Limongi, R.; G. Wiracocha; C. Yopez. 2011. Amarillo de Guayaquil (*Centrolobium ocoxylum* Rose ex Rudd) especie de uso múltiple del bosque seco del Ecuador. INIAP, Portoviejo. 32 p.
- Lobna, S.; M. Taha; I. Soad; M. Farahat. 2008. A Micropropagation Protocol of *Paulownia kowakamii* through in vitro culture technique. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 2(3):594-600

- Lucas, M.; E. Martínez; F. A. García; F. López; M. Abellan; D. Pérez; A. Cerro. 2010. Paulonia (*Paulownia elongata* x *fortunei*) cultivation to obtain wood and biomass in Castilla-La Mancha [Spain]: first results. *Foresta* [en línea] [fecha de consulta: 27 Marzo 2017], p. 106-110. Disponible en: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=ES2010001670>>
- Ordóñez, M. 2013. *Evaluación de medios de cultivo sobre las fases de micropropagación in vitro de la especie forestal nativa Yagual (Polylepis incana)*. Tesis Ing. en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí. 20 p.
- Ozaslan, M.; C. Can; T. Aytekin. 2005. Effect of explant source on in vitro propagation of *Paulownia tomentosa* Steud. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 19(3):20-26
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca. 2013. *Programa de incentivos para la reforestación con fines comerciales*. Guayaquil, Ecuador
- Ministerio del Ambiente. 2010. *Aprovechamiento de los recursos forestales en el Ecuador 2007-2009*. Quito-Ecuador
- Murashige, T.; F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15(3):473-497
- Palacios, W.; E. Vásquez; N. Jaramillo; M. Robalino. 2011. *Evaluación de la estrategia de Desarrollo forestal Sustentable 2006-2011*. Ministerio del Ambiente del Ecuador, Quito. 66p.
- Pérez, J. 1998. *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las plantas, Santa Clara. 965 p.
- Prado, L.; C. Samaniego; J. Ugarte-Guerra. 2010. *Estudio de las cadenas de abastecimiento de germoplasmas forestal en Ecuador*. World Agroforestry Centre (ICRAF), Lima. 247 p.
- Rao, C.; C. Goh; P. Kumar. 1993. High frequency plant regeneration from excised leaves of *Paulownia fortunei*. *In vitro Cell Dev Biol* 29(2):72-76
- Rout, G.; G. Reddy; P. Das. 2001. Studies on in vitro clonal propagation of *Paulownia tomentosa* Steud and evaluation of genetic fidelity through RAPD marker. *Silvae Genetica* 50:208-212
- Sharma, S. S.; R. Charan. 2003. Regeneration and multiplication of *Paulownia fortunei* (CO20 clone) through shoot tip culture. *Indian Journal of Soil Conservation* 31:276-280
- Song, S.; T. Sato; K. Ishii; A. Saito; K. Ohba. 1990. In vitro mass propagation by meristem culture of two mature trees of *Paulownia catalpifolia*. *Journal of the Japanese Forestry Society* 72(6):495-498
- Sunseri, F. 2001. *Tecniche di Coltura Cellulari* [en línea]. Fecha de consulta: 02 Febrero 2015. Disponible en: <https://www.unirc.it/documentazione/materiale_didattico/140_2012_316_15695.pdf>
- Ramírez, M. A.; V. M. Villalobos; R. Salgado. 2001. *Cultivo in vitro de Paulonia (Paulownia tomentosa)*. INIFAP. 19 p.
- Wayne, K.; G. Donald. 2004. *Tree crops for marginal farmland*. University of Tennessee. 31 p.
- Yenkateswarlu, B.; J. Mukhopadhyay; E. Sreenivasan; V. Moses. 2001. Micropropagation of *Paulownia fortunei* through in vitro axillary. *Indian Journal of Experimental Biology* 39:594-599
- Zayova, E. 2011. *Micropropagation of Paulownia (Paulownia elongata)*. Agricultural Academy, Bulgaria.
- Zhu, Z. H., C. J. Chao; X. Y. Lu; Y. G. Xiong. 1986. *Paulownia in China: cultivation and utilization*. Beijing, China.

