

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

VALIDACIÓN Y DESARROLLO DE UNA TECNOLOGÍA PARA LA
MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* Y UN
HÍBRIDO (*P. fortunei* x *P. elongata*) BAJO SISTEMAS DE PROPAGACIÓN
CONVENCIONAL E INMERSIÓN TEMPORAL.

AUTORA:

ANGÉLICA MARIBEL CÁRDENAS RUBIO

DIRECTORA:

IVONNE DE LOS ÁNGELES VACA SUQUILLO

Quito, marzo del 2015

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Autorizo a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de titulación y su reproducción sin fines de lucro.

Además, declaro que los conceptos, análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Quito, marzo 2015

Angélica Maribel Cárdenas Rubio

CI: 1719281972

DEDICATORIA

Al ser supremo, Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto de mi vida profesional y poder cumplir mis objetivos y sueños, además por haberme brindado su infinita bondad y amor.

A mis padres Teodoro Cárdenas y Elbia Rubio, que me dieron la vida, sus consejos, sus valores y sobre todo el amor.

A mis abuelitos Rosa Núñez y Miguel Rubio, por ser en mi vida un ejemplo de lucha, dedicación, por ser un pilar importante para mi desarrollo, por su amor, apoyo y por creer en mí siempre.

A mis hermanos quienes me brindaron su apoyo en todos los instantes de mi vida, con quienes compartí los momentos más bonitos de mi niñez.

A mi amor quién me ha incentivado en las etapas más difíciles de este proceso de mi vida, quien ha sido mi apoyo y complemento

Infinitas gracias a mis amig@s Yamis, Thalys, Tami, Pao, Gaby, Bachita, Mami Gio, Santy Q, Kary, Giga, Joha, Dani S, Anita, Sory, Vero, Andresito, Win 1, Win 2, Ing. Marcelo, Sra. Mary, Veci, Franklin, Pato, Dani G, Fabián, Emilio, Marinita, Roy, por todas las cosas que vivimos juntos, los buenos y los malos momentos. Gracias por ser parte importante en mi vida.

Angie

AGRADECIMIENTO

A la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los RR.NN, Universidad Politécnica Salesiana, en especial a mis profes: Ing. Dianita Calero, Ing. Rosita Espinoza, Lcda. Germania Karolys, BQ Wilson Tapia, Ing. Laurita Huachi, BQ Cristian Larenas, BQ Paco Noriega por apoyarme, brindarme sus conocimientos y sobre todo su amistad.

Al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) “Estación Experimental Santa Catalina”, al Ing. Raúl Ramos líder del Programa Nacional de Forestería por brindarme la oportunidad y confianza para la elaboración de éste trabajo, mil gracias, al Departamento Nacional de Biotecnología por darme las facilidades para realizar esta investigación.

Al Ing. Paulo Barrera, técnico del Programa Nacional de Forestería por brindarme su amistad, conocimientos y confianza.

A la Lcda. Katerine Orbe, líder del Departamento Nacional de Biotecnología, por el apoyo, confianza y amistad en el transcurso del desarrollo de la tesis.

A mi tutora de tesis, Ing. Ivonne Vaca, por la colaboración científica, por su comprensión y por animarme a seguir adelante durante el desarrollo de la presente investigación.

A todos los profesionales que contribuyeron con su ayuda, Ing. Santiago Meneses, por su apoyo durante mis primeros meses en el INIAP, al Dr. Jorge Grijalva, por la colaboración en la fase inicial de investigación, a la Ing. Dianita Iles, quien más que una jefa fue una amiga incondicional, quien me supo guiar y motivar para culminar mi trabajo, mil gracias por tu paciencia y conocimientos.

Angie

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	
MARCO TEÓRICO.....	7
1.1 <i>Paulownia</i>	7
1.1.1 Descripción general de <i>Paulownia</i>	7
1.1.2 Origen del cultivo y distribución de <i>Paulownia</i>	7
1.1.3 Clasificación taxonómica	8
1.1.4 Descripción Morfológica	9
1.1.5 Diversidad genética del género <i>Paulownia</i>	12
1.1.6 Aspectos ecológicos	14
1.1.7 Aplicaciones de <i>Paulownia</i>	15
1.1.8 Propagación de <i>Paulownia</i>	16
1.2 Cultivo de tejidos vegetales	18
1.2.1 Fases de la Micropropagación.....	19
1.2.1.1 Fase preparativa: Pretratamientos del material vegetal para su cultivo in vitro	19
1.2.1.2 Fase de establecimiento: iniciación in vitro.....	20
1.2.1.3 Fase de Multiplicación o proliferación in vitro.....	23
1.2.1.4 Fase de enraizamiento in vitro	30
1.2.1.5 Fase de aclimatación de la vitroplanta	31
1.2.2 Factores que influyen en la micropropagación	32

1.2.2.1	<i>Planta que dona el explante</i>	32
1.2.2.2	<i>Tipo y edad del explante</i>	32
1.2.2.3	<i>Factores físicos que influyen en el desarrollo in vitro de una planta</i>	33
1.2.2.4	<i>Medios de cultivo</i>	34
1.2.3	Métodos de propagación <i>in vitro</i>	40
1.2.3.1	<i>Organogénesis directa</i>	40
1.2.3.2	<i>Organogénesis indirecta</i>	42
1.2.3.3	<i>Embriogénesis somática</i>	42

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS	44	
2.1	Localización del estudio.....	44
2.2	Condiciones del cultivo.....	44
2.3	Materiales.....	46
2.3.1	Material vegetal.....	46
2.3.2	Materiales de laboratorio.....	46
2.3.3	Equipos de laboratorio	47
2.3.4	Reactivos	48
2.3.5	Equipos y material de oficina.....	48
2.3.6	Material de campo.....	48
2.4	Metodología	49

2.4.1	Fase I: Introducción <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).....	49
2.4.1.1	<i>Factores en estudio</i>	49
2.4.1.2	<i>Tratamientos</i>	50
2.4.1.3	<i>Unidad Experimental</i>	52
2.4.1.4	<i>Análisis estadístico</i>	52
2.4.1.4.1	<i>Diseño experimental</i>	52
2.4.1.4.2	<i>Esquema del análisis de la varianza</i>	52
2.4.1.4.3	<i>Análisis funcional</i>	52
2.4.1.5	<i>Variables y métodos de evaluación</i>	53
2.4.1.5.1	<i>Porcentaje de contaminación (%)</i>	53
2.4.1.5.2	<i>Longitud de brote (cm)</i>	53
2.4.1.5.3	<i>Porcentaje de brotación (%)</i>	53
2.4.1.5.4	<i>Porcentaje de oxidación (%)</i>	53
2.4.1.6	<i>Manejo específico del Experimento</i>	54
2.4.2	Fase II: Multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>) bajo el sistema convencional e inmersión temporal	56
2.4.2.1	<i>Sistema convencional</i>	56
2.4.2.1.1	<i>Factores en estudio</i>	56
2.4.2.1.2	<i>Tratamientos</i>	58
2.4.2.1.3	<i>Unidad experimental</i>	59

2.4.2.1.4	<i>Análisis estadístico</i>	59
2.4.2.1.5	<i>Variables y métodos de evaluación</i>	60
2.4.2.1.6	<i>Manejo específico del Experimento</i>	61
2.4.2.2	<i>Sistemas de Inmersión temporal</i>	62
2.4.2.2.1	<i>Factores en estudio</i>	62
2.4.2.2.2	<i>Tratamientos</i>	62
2.4.2.2.3	<i>Unidad Experimental</i>	63
2.4.2.2.4	<i>Análisis estadístico</i>	63
2.4.2.2.5	<i>Variables y Métodos de Evaluación</i>	65
2.4.2.2.6	<i>Manejo específico del Experimento</i>	66
2.4.3	Fase III: Enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>), en medio sólido de explantes provenientes del sistema convencional.	68
2.4.3.1	<i>Factores en estudio</i>	68
2.4.3.2	<i>Tratamientos</i>	69
2.4.3.3	<i>Unidad Experimental</i>	69
2.4.3.4	<i>Análisis estadístico</i>	70
2.4.3.4.1	<i>Diseño experimental</i>	70
2.4.3.4.2	<i>Esquema del análisis de la varianza</i>	70
2.4.3.4.3	<i>Análisis funcional</i>	70
2.4.3.5	<i>Variables y métodos de evaluación</i>	71
2.4.3.5.1	<i>Número de raíces</i>	71

2.4.3.5.2	<i>Longitud de las raíces (cm)</i>	71
2.4.3.5.3	<i>Longitud de la plántula (cm)</i>	71
2.4.3.6	<i>Manejo específico del Experimento</i>	71
2.4.4	Fase IV: Adaptación a condiciones de invernadero para plántulas obtenidas del sistema de micropropagación convencional.	72
2.4.4.1	<i>Factores en estudio</i>	72
2.4.4.2	<i>Tratamientos</i>	73
2.4.4.3	<i>Unidad Experimental</i>	73
2.4.4.4	<i>Análisis estadístico</i>	74
2.4.4.4.1	<i>Diseño experimental</i>	74
2.4.4.4.2	<i>Esquema del análisis de la varianza</i>	74
2.4.4.4.3	<i>Análisis funcional</i>	74
2.4.4.5	<i>Variables y métodos de evaluación</i>	75
2.4.4.5.1	<i>Porcentaje de prendimiento (%)</i>	75
2.4.4.5.2	<i>Longitud de la planta (cm)</i>	75
2.4.4.6	<i>Manejo específico del Experimento</i>	75

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
3.1 Recolección del material vegetal	77
3.2 Fase I: Introducción <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).	77
3.2.1 Porcentaje de contaminación (%).....	77

3.2.2	Longitud de brote	79
3.2.3	Porcentaje de brotación (%)	85
3.2.4	Porcentaje de oxidación (%)	87
3.3	Fase II: Multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>) bajo el sistema convencional e inmersión temporal.	90
3.3.1	Sistema convencional.....	90
3.3.1.1	Altura de brotes	90
3.3.1.2	Número de nudos	95
3.3.1.3	Índice de multiplicación.....	101
3.3.1.4	Tasa de pérdida	103
3.3.2	Sistema de Inmersión Temporal.....	103
3.3.2.1	Brotación de explantes (%).....	103
3.3.2.2	Longitud de brote	105
3.3.2.3	Porcentaje de brotes hiperhidratados	108
3.3.2.4	Índice de multiplicación.....	109
3.4	Fase III: Enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>), en medio sólido de explantes provenientes del sistema convencional	111
3.4.1	Número de raíces.....	111
3.4.2	Longitud de la raíces	115
3.4.3	Longitud de la plántula (cm).....	118

3.5	Fase IV: Adaptación a condiciones de invernadero para plántulas obtenidas del sistema de micropropagación convencional.....	122
3.5.1	Porcentaje de prendimiento.....	122
3.5.2	Longitud de la planta.....	124
	CONCLUSIONES	129
	RECOMENDACIONES	131
	LISTA DE REFERENCIAS	132

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación taxonómica de género <i>Paulownia</i>	9
Tabla 2: Conjunto de sustancias que se añaden a los medios de cultivo para inducir el crecimiento y desarrollo.....	35
Tabla 3: Componentes de algunos medios de cultivo <i>in vitro</i> más utilizados	37
Tabla 4: Condiciones del sitio experimental.....	44
Tabla 5: Medios de cultivo utilizados en la etapa I: Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP), 2014.....	50
Tabla 6: Tratamientos de desinfección e introducción <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).	51
Tabla 7: ADEVA para el establecimiento de un protocolo de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).INIAP, Cutuglagua-Pichincha, 2014	52
Tabla 8: Medios de cultivo utilizados en la etapa II: Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP), 2014.....	57
Tabla 9: Tratamientos para la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>), Cutuglagua-Pichincha, 2014	58
Tabla 10: ADEVA para el establecimiento de un Medio de multiplicación para <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>). INIAP, Cutuglagua-Pichincha, 2014.....	59
Tabla 11: Tratamientos para Multiplicación bajo sistemas de Inmersión Temporal de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>). INIAP, Cutuglagua-Pichincha, 2014.....	63

Tabla 12: ADEVA para la multiplicación bajo sistemas de inmersión temporal de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>). INIAP, Cutuglagua – Pichincha 2014.	64
Tabla 13: Medios de cultivo utilizados en la etapa III: Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP), 2014.....	68
Tabla 14: Tratamientos para el enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>). INIAP, Cutuglagua-Pichincha, 2014.	69
Tabla 15: ADEVA para el establecimiento de un Medio de enraizamiento para <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>). INIAP, Cutuglagua-Pichincha, 2014.....	70
Tabla 16: Tratamientos para la adaptación a condiciones de invernadero de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>). INIAP, Cutuglagua-Pichincha, 2014.....	73
Tabla 17: ADEVA para la evaluación de la adaptación de plantas obtenidas <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>). INIAP, Cutuglagua – Pichincha 2014.	74
Tabla 18: Porcentajes de contaminación a los 15 días de evaluación en la fase I de establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).	79
Tabla 19: ADEVA para la variable longitud de brote evaluada a los 20 días para el establecimiento de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido.....	80
Tabla 20: Promedios y pruebas de significación para la variable longitud de brote evaluada a los 20 días, para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).	84

Tabla 21: Porcentajes de brotación a los 10,20 y 30 días de evaluación en la fase I de establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).....	87
Tabla 22: Porcentajes de oxidación a los 15 días de evaluación en la fase I de establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).....	89
Tabla 23: ADEVA para la variable altura de brotes evaluada para la multiplicación de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).....	91
Tabla 24: Promedios y pruebas de significación para la variable altura de brotes para la evaluación a los 10 días de multiplicación de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).....	94
Tabla 25: ADEVA para la variable número de nudos evaluada a los 10, 20 y 30 días para la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>) bajo el sistema convencional. .	95
Tabla 26: Promedios y pruebas de significación para la variable número de nudos a los 10 días para la evaluación de la multiplicación de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).	100
Tabla 27: Índice de multiplicación para la fase II para <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>) bajo el sistema convencional.	102
Tabla 28: Porcentajes de brotación a los 15 y 30 días de evaluación en la fase II de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>) bajo SIT	105

Tabla 29: ADEVA para la longitud de brote de evaluada a los 30 días para la multiplicación de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei x Paulownia elongata</i>) bajo el sistema de inmersión temporal.....	105
Tabla 30: Promedios y pruebas de significación para la variable longitud de brote para la evaluación a los 30 días de multiplicación de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei x Paulownia elongata</i>) bajo SIT.....	107
Tabla 31: Índice de multiplicación para la fase II para <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei x Paulownia elongata</i>) bajo el Sistema de Inmersión Temporal.....	111
Tabla 32: ADEVA para la variable número de raíces evaluada para el enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei x Paulownia elongata</i>).	112
Tabla 33: Promedios y pruebas de significación para la variable número de raíces a los 30 días para la evaluación del enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei x Paulownia elongata</i>).	114
Tabla 34: ADEVA para la variable longitud de raíces evaluada para el enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei x Paulownia elongata</i>).	115
Tabla 35: Promedios y pruebas de significación para la longitud de raíces a los 30 días para la evaluación del enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei x Paulownia elongata</i>).....	118
Tabla 36: ADEVA para la variable longitud la plántula evaluada para el enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei x Paulownia elongata</i>).....	118

Tabla 37: Promedios y pruebas de significación para la longitud de raíces a los 30 días para la evaluación del enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).....	122
Tabla 38: Porcentajes de prendimiento a los 10, 20, 30 y 45 días de evaluación en la fase IV de adaptación de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).....	124
Tabla 39: ADEVA para la variable longitud de la planta evaluada a los 10, 20, 30 y 45 días en la etapa IV adaptación de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).	125
Tabla 40: Promedios y pruebas de significación para la variable longitud de la planta los 45 días para la evaluación de la adaptación de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).....	128

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución natural <i>P. elongata</i> y <i>P. fortunei</i>	8
Figura 2: Flores de <i>Paulownia fortunei</i>	10
Figura 3: Evaluación del tamaño de una hoja	11
Figura 4: Semillas de <i>Paulownia</i>	11
Figura 5: Frutos de <i>Paulownia</i>	12
Figura 6: Diferencias morfológicas entre <i>P. fortunei</i> y <i>P. elongata</i>	13
Figura 7: A) Instrumentos musicales a base de madera de <i>Paulownia</i> . B) Muebles a base de madera de <i>Paulownia</i>	16
Figura 8: A) sistema para la micropropagación de vainilla en el Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA®), B) caña de azúcar en el Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT) y C) orquídeas en el Biorreactor de Inmersión por Gravedad (BIG).....	27
Figura 9: Biorreactor en estado de reposo (1); comienza a ingresar aire al sistema (2); plantas inmersas en el medio de cultivo (3); el medio de cultivo desciende por gravedad a la recámara inferior (4).	28
Figura 10: Modelo de sistema inmersión temporal líquido BIT.	29
Figura 11: Biorreactor de Inmersión por gravedad.....	30
Figura 12: Plantas del género <i>Paulownia</i> mantenidas en invernadero del laboratorio de Cultivo de Tejidos del Programa Nacional de Biotecnología del INIAP.....	45
Figura 13: Cuarto de cultivo cálido.....	45
Figura 14: Plantas <i>Paulownia</i> ubicadas en el Vivero Reforei.....	46
Figura 15: Proceso de desinfección para <i>P. elongata</i> , <i>P. fortunei</i> y un híbrido.....	55
Figura 16: Multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> , y un híbrido (<i>P. fortunei</i> x <i>P. elongata</i>) bajo el sistema convencional.	61

Figura 17: Multiplicación <i>in vitro</i> de <i>P. elongata</i> , <i>P. fortunei</i> , y un híbrido (<i>P. fortunei</i> x <i>P. elongata</i>) bajo el SIT.....	67
Figura 18: Enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>P. fortunei</i> x <i>P. elongata</i>).....	72
Figura 19: Adaptación de <i>P. elongata</i> , <i>P. fortunei</i> y un híbrido (<i>P. fortunei</i> x <i>P. elongata</i>).....	76
Figura 20: Plantas del género <i>Paulownia</i> spp.....	77

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Contaminación de explantes para la fase I de establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia</i>	145
Anexo 2: Medio de cultivo clásico que contiene macro y micronutrientes y vitaminas, (Murashige & Skoog, 1962) citado en (SIGMA-ALDRICH, 2014).....	145
Anexo 3: Gráfico de las medias para los 10, 20 y 30 días de longitud de brote para la Fase de establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).	146
Anexo 4: Gráfico del porcentaje de brotación a los 10, 20 y 30 días para la Fase de establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).	147
Anexo 5: Porcentaje de contaminación a los 15 días para la Fase de establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).	148
Anexo 6: Porcentaje de oxidación a los 15 días para la Fase de establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).	148
Anexo 7: Fotos de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>) para el etapa de establecimiento <i>in vitro</i>	149
Anexo 8: Gráfico de la altura de brotes para los 10, 20 y 30 días para la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>) bajo el sistema convencional.	150
Anexo 9: Gráfico del número de nudos para los 10, 20 y 30 días para la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>) bajo el sistema convencional.	150

Anexo 10: Fotos de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>) para la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> bajo el sistema convencional.....	151
Anexo 11: Gráfico de la brotación de explantes para los 15 y 30 días para la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>) bajo el Sistema de Inmersión Temporal	152
Anexo 12: Gráfica de la variable longitud de brote para la evaluación a los 30 días para la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido bajo el sistema de inmersión temporal.	152
Anexo 13: Fotos de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>) para la multiplicación <i>in vitro</i> bajo el Sistema de Inmersión Temporal.....	153
Anexo 14: Gráfica de la variable número de raíces para la evaluación a los 15 y 30 días para la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).....	154
Anexo 15: Gráfica longitud de raíces para la evaluación a los 15 y 30 días para la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).	154
Anexo 16: Gráfica para la longitud de plántula para la evaluación a los 15 y 30 días para la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).	155
Anexo 17: Fotos de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>) para el enraizamiento <i>in vitro</i>	156

Anexo 18: Gráfica longitud de planta para la evaluación a los 10, 20, 30 y 45 días para la etapa adaptación de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>).....	157
Anexo 19: Fotos de <i>Paulownia elongata</i> , <i>Paulownia fortunei</i> y un híbrido (<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i>) para el etapa de adaptación.....	158
Anexo 20: Glosario de términos	159

RESUMEN

Los individuos del género *Paulownia* pertenecen a la familia *Paulowniaceae*, son de origen asiático y su proceso de crecimiento es rápido. Existe interés por este género debido a sus características maderables, uso potencial en sistemas de producción, fijación de CO₂ y bioenergía. El objetivo de este trabajo fue validar y desarrollar una tecnología para la multiplicación *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) bajo sistemas de propagación convencional e inmersión temporal a partir de yemas, para lo cual se ejecutaron cuatro etapas: establecimiento, multiplicación, enraizamiento y adaptación en invernadero. Para la primera etapa, la desinfección se logró mediante el protocolo N°3 (Povidyn 1%+ Benomyl 1 g/L + Pyton 1%+ Rifampicina 0,5 mL/L+ hipoclorito de sodio al 1%+ Ácido ascórbico 100 mg/L + tween 20) en un medio de cultivo Murashige y Skoog (M&S) sin hormonas durante 30 días. Para la fase de multiplicación bajo el sistema convencional el mejor medio de cultivo fue (M&S 1x) suplementado con 0,2 mg/L BAP obteniéndose un mayor índice de multiplicación para *P. elongata* (16,4), *P. fortunei* (10,4) y del híbrido (15,5). Bajo el Sistema de Inmersión Temporal con el medio M3 (M&S 1 x + 0,2 mg/L BAP) se obtuvo un índice de multiplicación para *P. elongata* (4,18), *P. fortunei* (4,35) y el híbrido (3,42). Para la fase de enraizamiento el mejor medio de cultivo fue M&S suplementado con 0,4 mg/L IBA durante 30 días. En la fase de aclimatación el sustrato compuesto por turba, vermiculita y perlita arrojó los mejores resultados con un 100% de supervivencia.

Palabras clave: *Paulownia*, yemas, medio de cultivo, índice de multiplicación, sistema convencional, sistema de inmersión temporal, regulador de crecimiento.

ABSTRACT

The individuals of the genus *Paulownia* belong to the *Paulowniaceae* family; they are of Asian origin and fast-growing. There is an interest in this genus because of its timber characteristics, potential use in production systems, fixation CO₂ and bioenergy. The aim of this study was to validate and develop a technology for *in vitro* multiplication of *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* and a hybrid (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*), under conventional propagation system and temporary immersion system from buds and were executed in four stages: establishment, multiplication, rooting and adaptation in greenhouses. For the first stage, the disinfection is achieved by the protocol N°3 (Povidyn 1% + Benomyl 1 g / L + Python 1% + Rifampicin 0,5 mL / L + sodium hypochlorite 1% + ascorbic acid 100 mg / L + Tween 20) in M&S culture medium, without hormones for 30 days. For the multiplication phase under the conventional system, the best culture medium was (M&S 1x) supplemented with 0,2 mg / L BAP getting a higher rate of multiplication to *P. elongata* (16,4), *P. fortunei* (10,4) and a hybrid (15,5). Under the Temporary Immersion System, with the medium m3 (M&S 1x+ 2 mg/L BAP) was obtained higher rate of multiplication to *P. elongata* (4,18), *P. fortunei* (4,35) and a hybrid (3,42). For rooting phase the best culture medium was M&S supplemented with 0,4 mg / L IBA for 30 days. In the adaptation phase substrate composed of peat, perlite and vermiculite gave the best results with 100 % survival.

Keywords: *Paulownia*, buds, medium, multiplication rate, conventional system, temporary immersion system, growth regulator.

INTRODUCCIÓN

Formulación del problema

“Ecuador es un país relativamente pequeño, en sus 275000 Km² de territorio posee paisajes geográficos extremadamente variados y una extraordinaria diversidad biológica principalmente contenida en bosques nativos” (RED COUNTRIES DATABASE, 2012, pág. 3). “Sin embargo, la tendencia en los últimos años evidencia una reducción sistemática de este recurso, debido a la irracionalidad de la explotación maderera, procesos de colonización desordenada, tala ilegal y expansión de la frontera agrícola” (RED COUNTRIES DATABASE, 2012, pág. 4). “Este cambio en el uso del suelo ha ocasionado que la cobertura forestal en el país, pase de 13,81 millones de hectáreas en 1990 a 9,86 millones en 2010, principalmente debido a un aumento en tierras para uso agropecuario” (FAO, 2010, pág. 378).

El 49,37% del país se encuentra dedicado a la labor agrícola, en detrimento de tierras con aptitud forestal. La superficie forestal del país se encuentra dividida en: bosques naturales alrededor de 8,75 millones ha (98,19% de la superficie de bosques), bosques plantados 0,16 millones ha (1,79% de la cobertura forestal) y existen 2,16 millones ha para reforestación (MAE, 2011, págs. 23-24), cuyo aprovechamiento productivo adecuado podría significar un aporte considerable al Producto Interno Bruto (PIB) del país. Es así que, en el Plan Nacional de Desarrollo para el Buen Vivir se establece como parte de las políticas el “desarrollar proyectos de forestación, reforestación con especies nativas y adaptadas” y, se propone la meta de reducir la tasa de deforestación en un corto plazo mediante la forestación en áreas de aptitud forestal con especies de alto valor comercial y de rápido crecimiento (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, 2013, págs. 3-6).

La problemática radica en que la mayoría de bosques plantados en el país contienen especies forestales tales como: pino (*Pinus radita*, *P. patula*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*, *E. urograndis*), laurel (*Cordia allidora*), balsa (*Ochroma pyramidale*), pachaco (*Schizolobium parahiba*), y melina (*Gmelina arborea*). Estas especies

presentan problemas relacionados a la heterogeneidad en las plantaciones y deterioro de la calidad de la madera, causado principalmente por la baja calidad de la semilla, insectos, enfermedades y el desconocimiento de sus propiedades físico-mecánicas y el manejo silvicultural (Limongi, Guiracochoa, & Yépez, 2011, págs. 32-34).

Nace así la necesidad de buscar nuevas alternativas para contribuir a solventar las necesidades medio ambientales y económicas, mediante la introducción de especies maderables que crecen en menor tiempo que otras, como las pertenecientes al género *Paulownia* spp., mismas que poseen un crecimiento ultra-rápido, el primer año puede llegar a medir de entre 4 - 6 m de altura, teniendo el mayor incremento en volumen de tronco entre los 8 - 12 años (Zhao-Hua, Xin-Yu, & YaoGao, 1986, págs. 16-26).

“*Paulownia* pertenece a la familia *Paulowniaceae*” (Lahera, 2010, pág. 4). Nueve especies de este género son originarias de China excepto *Paulownia fortunei*, la cual se extiende hasta Vietnam y Laos, y *Paulownia tomentosa*, crece en Corea y Japón (Zhao-Hua, Xin-Yu, & YaoGao, 1986, págs. 3-6). “Específicamente para proyectos forestales, las especies más utilizadas son *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y *Paulownia kawakamii*” (Lucas, Martinez, López, Abellan, García, & Pérez, 2011, pág. 2).

El valor industrial y comercial que tiene este género radica en su rápido crecimiento, mucho mayor que el alcanzado por otras especies, hecho que lo hace muy productivo y rentable para quienes lo cultivan. Entre otros beneficios, se destacan la excelente calidad y belleza de su madera, considerable producción de biomasa y capacidad de fijación de CO₂, posibilidad de aprovechamiento del follaje para el ganado, potencial uso para reforestaciones de terrenos agrarios abandonados y/o degradados, valor ornamental, entre otros (Wayne & Donald, 2004, págs. 31-33).

Paulownia se reproduce a través de la propagación sexual y asexual (esquejes de tallo y raíz). Entre los problemas que existen en la multiplicación por semilla, es la alta variabilidad genética del material vegetal y la heterogeneidad de plantas en campo. Las herramientas biotecnológicas, entre ellas la multiplicación *in vitro* se presenta como una opción para solucionar este problema, dado que el crecimiento de

las plántulas es más homogéneo bajo las técnicas de esquejes y multiplicación *in vitro* (Bergmann & Moon, 1997, págs. 315-317).

Una ventaja adicional de las técnicas de multiplicación *in vitro* en comparación con los sistemas de propagación vegetativa convencional, es que mientras una estaca en campo únicamente es capaz de producir una planta, la multiplicación *in vitro* puede producir varias yemas y/o brotes adventicios en pocas semanas o meses y por tanto dar origen a muchas plantas (Biondi & Thorpe, 1982, págs. 197-199), lo que significaría que las necesidades de material vegetal para plantaciones comerciales, serían solventadas en poco tiempo.

En este contexto, el Programa Nacional de Forestería del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP, ejecuta el proyecto de investigación “Adaptación de especies forestales de rápido crecimiento del género *Paulownia* a diversos ambientes bioclimáticos y suelos del Ecuador”, en el cual uno de sus objetivos plantea el uso de las herramientas biotecnológicas y el desarrollo de protocolos para multiplicación masiva de estas especies, siendo a la vez parte complementaria de los estudios de adaptación de las especies forestales del género *Paulownia* en diversos ambientes bioclimáticos y de suelos del Ecuador.

Justificación

En el Ecuador la pérdida de recursos genéticos forestales es alarmante, ocasionada por varios factores entre ellos la destrucción de hábitats y ecosistemas, la sobre - explotación de flora silvestre, la contaminación ambiental, y la escasa atención que recibe el tema (Vásques & Ulloa, 1997, pág. 1). Es así que mediante el programa de incentivos para la reforestación con fines comerciales, se pretende aportar en la reducción del aprovechamiento indiscriminado del Bosque Nativo, mediante la introducción de especies maderables de rápido crecimiento que tengan un beneficio económico.

Por este motivo la Presidencia de la República del Ecuador se ha manifestado a través de la SENESCYT, el interés por explorar de manera prioritaria, la

introducción y evaluación de la adaptación de especies forestales foráneas con atributos de crecimiento rápido, particularmente especies del género *Paulownia*, como potenciales alternativas para contribuir a las prioridades políticas contempladas en el Plan Nacional de Forestación y Reforestación Productiva (Grijalva, Raúl, Barrera, & Limongi, 2012, págs. 2-3). Si la respuesta en campo es positiva, con estas especies se puede reforestar parte de las 2,62 millones de hectáreas de terrenos disponibles para repoblación forestal (MAE, 2011, págs. 1-2).

La mayoría de las especies forestales se reproducen sexualmente por polinización abierta, produciendo una gran cantidad de variantes fenotípicos y por consiguiente heterogeneidad en la descendencia. Los caracteres deseables de individuos superiores podrían conservarse en la progenie si estos se propagan vegetativamente o en forma clonal. En este ámbito, la aplicación de biotecnologías como la propagación *in vitro* permite la obtención de plántulas libres de organismos patógenos, homogeneidad en la progenie, mayor vigor de las plantas regeneradas y producción a gran escala de individuos con características deseadas.

En Ecuador, el uso de herramientas biotecnológicas en especies forestales no ha tenido la misma importancia que en cultivos agrícolas, es así que no existen protocolos desarrollados para multiplicación a gran escala de especies forestales; por lo que, mediante la información disponible publicada por varios autores foráneos y la habilidad del equipo técnico del laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP se pretende, con este trabajo de investigación, generar una tecnología para la multiplicación a gran escala de *Paulownia*.

Objetivos

Objetivo general

Validar y desarrollar una tecnología para la multiplicación *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*P. fortunei* x *P. elongata*) bajo sistemas de propagación convencional e inmersión temporal.

Objetivos específicos

- Determinar el protocolo para el establecimiento *in vitro* en la fase de introducción de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).
- Evaluar el efecto de cuatro diferentes medios de cultivo sobre la multiplicación *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) bajo el sistema de propagación convencional.
- Evaluar un medio de cultivo sobre la multiplicación *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) bajo sistemas de inmersión temporal.
- Determinar el medio de cultivo más eficiente para el enraizamiento de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) con explantes provenientes de la etapa de multiplicación convencional.
- Evaluar la adaptación a condiciones de invernadero de plántulas obtenidas del sistema de micropropagación convencional, utilizando dos sustratos diferentes.

Hipótesis

Hipótesis nula (H₀)

Paulownia elongata, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) no responden a la propagación masiva *in vitro* bajo el sistema convencional e inmersión temporal en condiciones del laboratorio de cultivo de tejidos.

Hipótesis alternativa (H_a)

Paulownia elongata, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) responden a la propagación masiva *in vitro* bajo el sistema convencional e inmersión temporal en condiciones del laboratorio de cultivo de tejidos.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 *Paulownia*

1.1.1 Descripción general de *Paulownia*

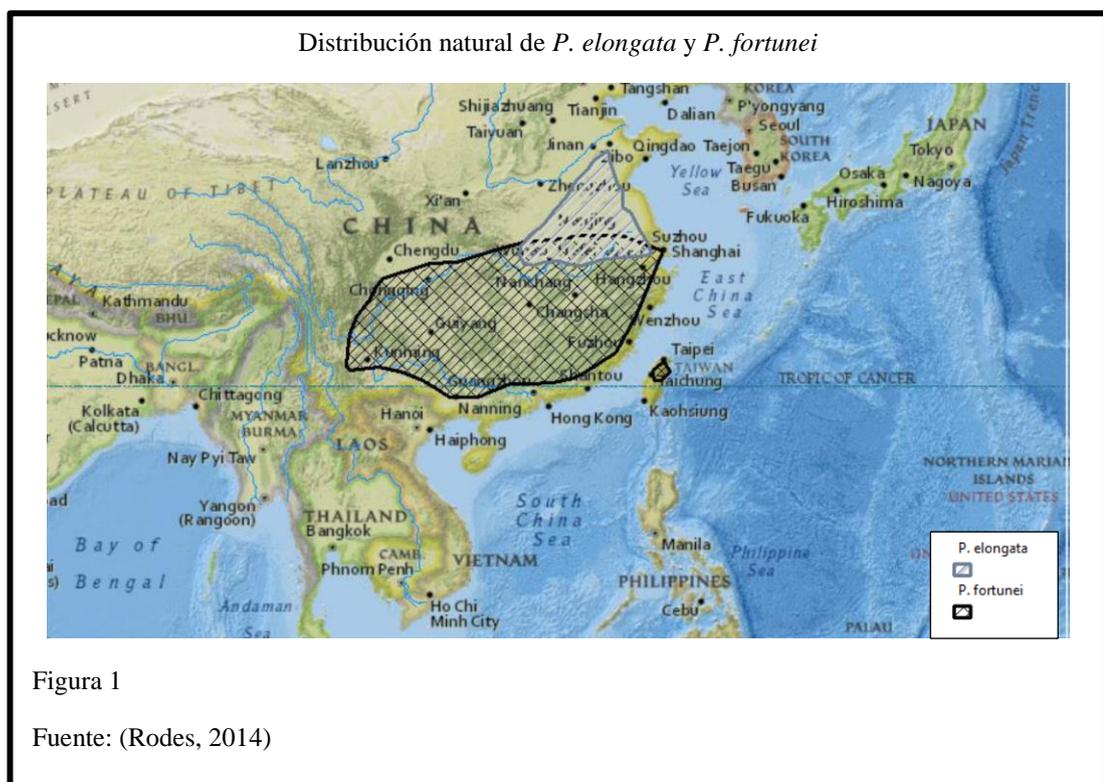
Los árboles pertenecientes al género *Paulownia* poseen un crecimiento rápido, siendo especialmente llamativos los primeros años de desarrollo. En condiciones normales, un árbol de 10 años de edad puede alcanzar los 30 - 40 cm de diámetro y un volumen de madera próximo a 0,3 - 0,5 m³. Sin embargo, si las condiciones de cultivo son óptimas, pueden alcanzar volúmenes de madera cercanos a los 4 - 4,5 m³, con unos crecimientos anuales en diámetro de 3 - 4 cm (Zhao-Hua, Xin-Yu, & YaoGao, 1986, págs. 2-10). “Dichos árboles presentan gran porte, de fuste recto y cilíndrico, de color grisáceo, con suaves estrías longitudinales” (Lucas, Martinez, López, Abellan, García, & Pérez, 2011, pág. 2).

1.1.2 Origen del cultivo y distribución de *Paulownia*

El género *Paulownia*, se cultiva hace más de 2600 años, pero empezó a ser estudiado a partir de 1972 por el investigador forestal de origen chino Zhua Zhao-Hua, inicialmente fue plantado por los agricultores chinos con el fin de proteger sus cultivos de tormentas de arena o inundaciones, asegurando así buenas cosechas. En la actualidad, después de diversas investigaciones se conocen en detalle todas sus virtudes tales como: árbol totalmente inocuo para el ambiente, rebrota cuando es cortado a los 3 años/ 8 veces como mínimo, produce 1 m³ de madera a partir del noveno año, solo necesita riego durante los 3 primeros años, permite cultivos intercalados, entre otras; por dichas ventajas, este árbol empezó a ser desarrollado genéticamente para ejecutar proyectos de investigación en adaptación a distintos ambientes climáticos a fin de promover su cultivo en el mundo, tanto para reforestación como para uso maderable y energético (Lucas, Martinez, López, Abellan, García, & Pérez, 2011, págs. 1-2).

“Estos árboles se han introducido por todo el mundo, desde el este de Asia (figura 1), principalmente en Japón y Corea, pasando por Indonesia, hasta Estados Unidos (Carolina del Norte y del Sur, California, Indiana y Kentucky), México, Brasil, India e Italia” (Lucas, Martínez, López, Abellán, García, & Pérez, 2011, pág. 1).

“También se conoce como el árbol de la emperatriz de China, el árbol de la princesa o el árbol Kiri. Las tres especies que comúnmente se recomiendan para la siembra son *Paulownia tomentosa*, *P. fortunei* y *P. elongata*” (Clatterbuck & Hodges, 2004, pág. 7).



1.1.3 Clasificación taxonómica

Thunberg, el botánico suizo que identificó y dio nombre a *Paulownia* en 1781, la clasificó dentro de la familia *Bignoniaceae*, aunque medio siglo más tarde, dos botánicos alemanes, Siebold y Zuccarini (1831) incluyeron a *Paulownia* dentro de la familia *Scrophulariaceae*. Sin embargo, desde 1998, en la clasificación APG I de la Angiosperm Phylogeny Group (Grupo para la Filogenia de las Angiospermas), se cambia la ubicación de *Paulownia*, sacándola del orden Scrophulariales y situándola en Lamiales, con una nueva familia monogenérica llamada *Paulowniaceae*. Esa

nueva filogenia se mantiene en el APG II del 2003 y en la nueva APG III, publicada en el 2009. Por desgracia, en innumerable bibliografía no actualizada, así como en la definición que de *Paulonia* hace el diccionario de la Real Academia, sigue apareciendo como una *Scrophulariaceae* (APG III, 2009 citado por Trigo (2013, pág. 1)).

La clasificación taxonómica es la siguiente:

Tabla 1

Clasificación taxonómica de género *Paulownia*

Reino:	Plantae
Superdivision:	Spermatophyta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Lamiales
Familia:	<i>Paulowiaceae</i>
Género:	<i>Paulownia</i>

Nota: APG III, 2009

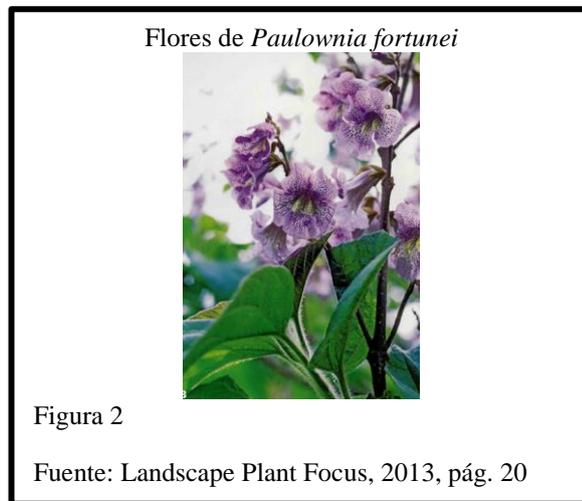
1.1.4 Descripción Morfológica

Raíces

Paulownia es un árbol de raíces profundas, con un sistema radicular bien desarrollado. Por lo general hay varias raíces grandes, dicotómicamente ramificadas que crecen hacia abajo hasta una longitud de 8 m. Las raíces de absorción son 1-5 mm de espesor y de hasta 60 cm de largo. En suelos arenosos, el 76% del sistema radicular de absorción es de 40 - 100 cm de profundidad. El desarrollo del sistema radicular está muy influenciado por la estructura del suelo; un suelo arenoso suelto y bien drenado, es ideal para *Paulownia* (Sedder, 2003, pág. 2).

Inflorescencia

“La floración de la especie se produce una vez por año, exhibiendo flores hermafroditas en panículas terminales de 30 a 40 cm de longitud con forma piramidal. Éstas, se forman en otoño y permanecen cerradas hasta la primavera” (Lucas, Martínez, López, Abellán, García, & Pérez, 2011, pág. 3). “Sus flores varían de color según la especie (figura 2), pueden presentar un color blanco o lavanda; son fragantes, tienen una gran corola de dos labios, con dos lóbulos en el labio superior y tres en la inferior” (Sedder, 2003, pág. 2).



Hojas

Se trata de una especie caducifolia, que presenta una copa ancha y ramas de crecimiento horizontal con hojas de gran tamaño, color verde oscuro en forma ovalada y acorazonada de 20 a 40 cm (figura 3), y de números pares opuestos en las ramas (Lucas, Martínez, López, Abellán, García, & Pérez, 2011, pág. 3).

“Las hojas tienen pecíolos largos y una disposición opuesta, la superficie inferior de las hojas está cubierta con una densa capa de pelos finos” (Sedder, 2003, pág. 2).

Evaluación del tamaño de una hoja



Figura 3

Fuente: Velboy EOOD, 2010

Semillas

“Las semillas de *Paulownia* son ligeras, pequeñas y aladas (figura 4). Su germinación y crecimiento requiere luz intensa debido a lo cual, esta especie no puede regenerar de forma natural bajo un dosel arbóreo” (Zhao-Hua, Xin-Yu, & YaoGao, 1986, pág. 4).

Semillas de *Paulownia*

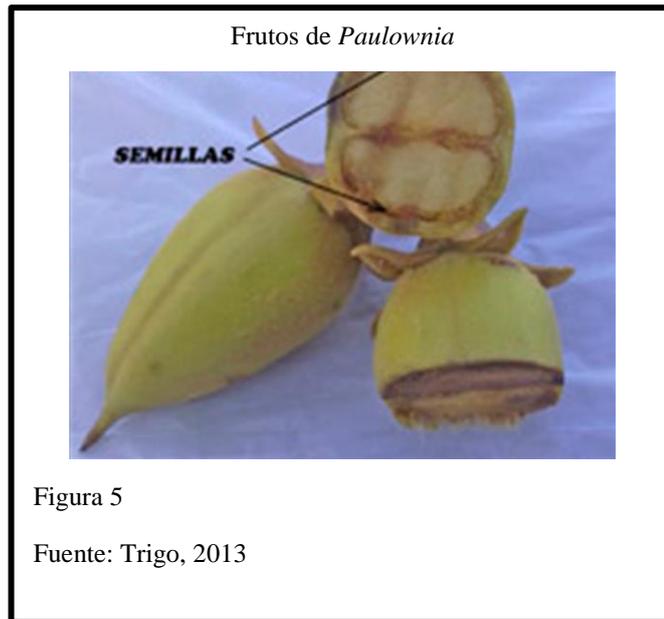


Figura 4

Fuente: Trigo, 2013

Frutos

“Los frutos son una cápsula leñosa dehiscente de forma ovoide (figura 5), puntiaguda, de 3 a 5 cm con numerosas semillas” (Lucas, Martínez, López, Abellan, García, & Pérez, 2011, pág. 3).



1.1.5 Diversidad genética del género *Paulownia*

El género incluye las especies: *Paulownia australis*; *P. catalpifolia*; *P. coreana*; *P. duclouxii*, *P. elongata*; *P. fargesii*; *P. fortunei*; *P. galbrata*; *P. grandifolia*, *P. imperialis*; *P. kawakamii*; *P. lilacina*, *P. longifolia*, *P. meridionalis*, *P. mikado*, *P. recurva*, *P. rehderiana*, *P. shensiensis*, *P. silvestrii*, *P. taiwaniana*; *P. thyrsoides*, *P. tomentosa*, *P. viscosa*, entre otras, (Lucas, Martínez, López, Abellán, García, & Pérez, 2011, pág. 1).

Paulownia elongata

Es un árbol de más de 10 m de altura, de copa ancha y cónica, presenta un fuste recto de corteza marrón- grisáceo con ramas marrones densamente pobladas de lenticelas. Poseen hojas de forma ovada- cordada, hasta 34 cm. La cara adaxial se encuentra densamente poblada de pubescencia mientras la cara abaxial permanece lampiña. Tiene flores de color azul claro con los centros amarillos. Presenta flores agrupadas en inflorescencias cónicas - piramidales de hasta 30 cm, con cimas de 3 a 5 flores y con pedúnculos de 0,8 a 2 cm, aproximadamente igual de largos que los pedicelos. El cáliz tiene forma oval - cónica y mide de 1,6 a 2 cm de largo, con 5 lóbulos hendidos hasta 1/3 de la longitud del mismo. Posee un fruto de forma ovoide, raramente ovoide-elipsoidal de 3,5 a 5 cm. Posee un pericarpo de 1 - 2,5 mm y semillas de 4 a 5 mm con ala incluida (Castillo, Gutiérrez, Buenrostro, & Cetina, 2012, págs. 41-42).

“Puede soportar temperaturas de hasta -15 °C, aunque las heladas pueden dañar los brotes jóvenes” (Landscape Plant Focus, 2013, pág. 21). Su estructura se puede observar en la figura 6.

Paulownia fortunei

Es un árbol que puede alcanzar hasta los 30 m de altura, de copa cónica; posee un fuste recto de corteza marrón - grisácea que puede llegar a los 2 m de diámetro normal. Tiene hojas de alrededor de 12 cm de diámetro. Sus flores forman una panícula compacta y cremosa de color blanco, o lila enrojecida y fuertemente marcada con el interior púrpura. El cáliz es cónico - oval y hendido hasta 1/4-1/3 de su longitud total. Posee estambres que miden de 3-3,5 cm. Tiene un fruto marrón-amarillento, estrellado y tomentoso, posee pericarpo leñoso, grueso y un cáliz persistente, alberga de 6 a 10 semillas aladas (Zhao-Hua, Xin-Yu, & YaoGao, 1986, págs. 2-16). Su estructura se puede observar en la figura 6.

Diferencias morfológicas entre *P. fortunei* y *P. elongata*

	Tipo de inflorescencia	Flores	Fruto	Semillas	Pelosidad en el envés de la hoja
<i>Paulownia elongata</i>					
<i>Paulownia fortunei</i>					

Figura 6

Fuente: (Zhao-Hua, Xin-Yu, & YaoGao, 1986)

Paulownia híbrida (*Paulownia elongata* x *Paulownia fortunei*)

Árbol grande, de sombra para grandes paseos, utilizado para madera. Planta con mucho futuro para la silvicultura por su impresionante desarrollo y crecimiento. La altura puede variar dependiendo de la época del año. El color de las hojas es verde,

posee flores de color blanco, el árbol puede llegar a una altura de 30 m. Este híbrido necesita un pH del suelo de alrededor de 7 (Garden Center Ejea Ctra, 2014, págs. 1-2). “Los híbridos de *Paulownia elongata* se seleccionan con el fin de mejorar algunas de las características de la especie, por ejemplo aumentar la resistencia al frío” (One green future, 2009, pág. 1).

Una ventaja de estos híbridos es la mejoría sinérgica de la combinación de los parentales, superando a éstos, pero otra es la infertilidad, lo que evita que una especie pueda llegar a ser invasiva y se convierta en plaga por los alrededores de la plantación. Aunque esto es un tema muy discutido. Los animales híbridos son estériles, pero las plantas pueden serlo o no dependiendo de ciertas afinidades entre los parentales (Trigo, 2013, págs. 1-2).

1.1.6 Aspectos ecológicos

Clima

Se adapta a una gran variedad de climas, pues el rango de temperaturas al que pueden adecuarse las especies del género varía ampliamente, llegando a soportar mínimas absolutas de -20 °C y máximas absolutas de 45 °C. Diferentes experiencias, demuestran que el rango óptimo de temperaturas para el crecimiento en altura y diámetro, se localiza usualmente entre 24 y 29 °C de temperatura media diaria (Zhao-Hua, Xin-Yu, & YaoGao, 1986, págs. 16-22). “En relación a la altitud, el rango que normalmente ocupa esta especie varía entre los 600 y 1500 msnm” (Lucas, Martinez, López, Abellan, García, & Pérez, 2011, pág. 2).

Suelos

El árbol de *Paulownia* tiene la capacidad de desarrollarse en suelos pobres o erosionados, siempre y cuando se aporte abono orgánico y un sistema de riego. *Paulownia* no es un árbol propio de zonas áridas, pero desde el punto de vista económico, esta especie desarrolla un óptimo uso de los recursos disponibles, y su capacidad de crecimiento es la más elevada del reino vegetal (Gutiérrez & Ocaña, 2009, págs. 23-24).

Los suelos adecuados para establecer plantaciones de *Paulownia* son aquellos de base arenosa, incluyendo margas y suelos volcánicos, el pH del suelo puede variar desde moderadamente ácido (5,5), a moderadamente alcalina (8,5), pero prefieren muy ligeramente ácido a 6,5 (Aitken-Christie, KozaiT, & Takayama, 1995, págs. 24-32).

1.1.7 Aplicaciones de *Paulownia*

La madera de *Paulownia* se distingue por tener algunas características organolépticas diferenciales que, la han posicionado como una madera semipreciosa: color claro, muy resistente, ultraligera, fácil de trabajar y de grano fino, preferida para la construcción por sus excelentes características de trabajo y alta resistencia al fuego pues su temperatura de ignición está entre los 420 y 430 °C, comparada con el promedio de las maderas duras que va de 220 a 225 °C. Además, es resistente a la deformación, torsión y agrietamiento; posee una gran capacidad aislante y un tiempo de secado muy corto de 24 - 48 horas en hornos para madera y 30 - 60 días al aire libre, posee infinidad de utilidades: carpintería en general, construcción, pasta de celulosa, planchas y contrachapados, entre otras (Lucas, Martínez, López, Abellan, García, & Pérez, 2011, págs. 4-6). “También su madera es ampliamente usada para la fabricación de muebles, aviones, juguetes, instrumentos musicales como se muestra en la figura 7 y, la reforestación de los suelos pobres en nutrientes” (Melhuish, Gentry, & Beckjord, 1990, pág. 206).

Entre los beneficios de las especies del género *Paulownia* destacan la considerable producción de biomasa, la fijación de CO₂, el potencial uso para reforestaciones de terrenos agrícolas abandonados. La especie es capaz de producir unos 6000 kg/ha de biomasa total, con un poder calorífico inferior de 19500 kJ/kg, valor superior a la producción de otras especies forestales y agrícolas (Lucas, Martínez, López, Abellan, García, & Pérez, 2011, págs. 1-2).

Aplicaciones de la madera de *Paulownia*



Figura 7: A) Instrumentos musicales a base de madera de *Paulownia*. B) Muebles a base de madera de *Paulownia*

Fuente: Velboy EOOD, 2010

“El árbol puede ser cosechado en cinco años a 13,72-15,24 m de altura, produciendo un beneficio bruto de unos 30000 dólares por 4046,9 m²/ha por año” (Newcomb, 2010, pág. 7).

1.1.8 Propagación de *Paulownia*

Propagación por semilla

Paulownia comienza a producir semilla al cuarto año de plantación. Sus semillas son livianas, una cápsula contiene alrededor de 5000 semillas. Una vez obtenidas las semillas, se siembran en almácigos en los meses de agosto o septiembre, con una densidad de 1000 a 1500 semillas por metro cuadrado. El tiempo de germinación varía de 15 a 60 días después de la siembra según las condiciones ambientales en que se desarrollan. Cuando las plantitas alcanzan una altura de 15 a 20 cm, se trasplantan al lugar definitivo que generalmente se realiza en los meses de diciembre y febrero (Instituto de Bienestar Rural, 1977, pág. 2).

“La propagación de *Paulownia* a partir de semilla es lenta, además produce una gran cantidad de variantes fenotípicas propia de la reproducción sexual” (Castellanos, Rodríguez, Rodríguez, & Rodríguez, 2006, pág. 2). “También otro problema asociado, es que las semillas pueden presentar dormancia. Para *P.elongata* el

porcentaje de germinación es de un 72% mientras que para *P. fortunei* es de un 68%” (Bergmann & Moon, 1997, pág. 4).

Propagación por estaca

Esta multiplicación es realizada en vivero. La preparación de las estacas se debe hacer cuando las plantas carecen de hojas. Se seleccionan las ramas que tienen de 15 a 30 cm de largo y de 1 a 2 cm de grosor que deberán tener más de dos brotes cada una. Las estacas se deben plantar a distancia conveniente y de forma horizontal en el vivero en los meses de agosto y septiembre. Una vez plantada se le debe cubrir con una capa de tierra de alrededor de 5 cm de espesor y, para evitar la deshidratación se le debe cubrir al almácigo con paja o heno. Generalmente la brotación de las estacas comienza a los 30 o 40 días después de la plantación, que deberán ser trasplantados al lugar definitivo en el mes de noviembre, época en que las plantas alcanzan de 20 a 30 cm de altura (Instituto de Bienestar Rural, 1977, pág. 3).

Propagación por raíz

Para este método primeramente se seleccionan las plantas madres de las que se extraerán las “raíces de multiplicación”. En el mes de agosto se extraen las raíces de la planta madre de las que se pueden obtener de 30 a 50 raíces por cada planta de un año. Las mismas deberán tener de 8 a 10 cm de largo y su diámetro deberá sobrepasar 3 cm. Luego se plantan en el vivero a distancia de 10 a 15 cm entre plantas, cubriéndolas con tierra con un espesor de 2 a 5 cm. En los meses de octubre y noviembre se los debe trasplantar al lugar definitivo (Instituto de Bienestar Rural, 1977, pág. 3).

La propagación por estacas o raíz es importante para la producción de material de plantación genéticamente uniforme, pero también hay dificultades asociadas con la propagación de corte de la raíz y, estos pueden incluir daños físicos a la epidermis de la raíz y corteza, decaen debido a las altas temperaturas y a los ataques de organismos patógenos (Ipekci & Gozukirmizi, 2003, págs. 16-24).

1.2 Cultivo de tejidos vegetales

“El cultivo de tejidos vegetales, es un conjunto de técnicas que permite el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de la planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales y asépticas” (Pérez J. , 1998, pág. 80).

Así mismo, es una herramienta de gran valor para la resolución de problemas básicos y aplicados en la biología molecular y biotecnología vegetal, ya que brinda la oportunidad de diseñar modelos ideales para el estudio de la fisiología, bioquímica, genética, clonación, conservación, manipulación *in vitro* y la obtención de plantas genéticamente modificadas (Ross & Neill, 2000, págs. 2-4).

El cultivo de tejidos en especies forestales se inició con el trabajo de Gautheret en 1934, cuando publicó su estudio “desarrollo de un callo sobre porciones de tejido de *Salix capraea* y *Populus nigra*”. Gautheret, describió la obtención de yemas adventicias y tallos con hojas *in vitro* de *Sequoia sempervirens*, pero no obtuvo la formación de plantas completas (Ball, 1950, págs. 295-325).

La mayoría de las especies forestales se reproducen sexualmente por polinización abierta, lo que mantiene una continua variación de muchos caracteres en las subsecuentes generaciones. Las características deseables podrían conservarse en la progenie si estos árboles se propagan vegetativamente o en forma clonal (Hartman & Kester, 1975, págs. 271-272).

Las técnicas de cultivo de tejidos brindan gran potencial para la multiplicación de especies forestales, además ayuda a los métodos tradicionales de mejoramiento genético forestal, particularmente en el área de evaluación de genotipos en lo que respecta a tasas de crecimiento, resistencia a enfermedades y tolerancia a la sequía. Estos métodos también pueden ayudar a explorar mutaciones espontáneas y características cuantitativas, las cuales no pueden obtenerse por métodos sexuales (Aguilar, Vilalobos, & Salgado, 2001, págs. 345-346).

“Las técnicas de propagación *in vitro* se han utilizado para varias especies, así como dos híbridos de *Paulownia*” (Ipekci & Gozukirmizi, 2003).

El éxito de *Paulownia* es la propagación *in vitro* o micropropagación, una técnica que aporta grandes ventajas. La práctica totalidad de las explotaciones forestales de *Paulownia*, se crean a partir de plántones obtenidos en laboratorio, clones de súper árboles muy seleccionados que, transmiten las mismas características de crecimiento desorbitado a sus descendientes. Una plantación de clones no sólo dará como fruto los mejores ejemplares, sino que proporcionará homogeneidad de crecimiento y si se trata de ejemplares producidos mediante micropropagación, iniciaremos la plantación en ausencia de enfermedades y plagas (lo que no implica que tal esterilidad impida el contagio posterior) (Trigo, 2013, págs. 1-3).

1.2.1 Fases de la Micropropagación

El objetivo de la micropropagación es la obtención de una cantidad adecuada de plantas de idénticas características a las plantas madre. Los protocolos de micropropagación, generalmente se dividen en una serie de fases o etapas que conducirán finalmente a la obtención de las vitroplantas (Pérez F. , 2004, págs. 122-126).

“Estas fases dependen mucho de la naturaleza del material vegetal que se está cultivando” (Pérez F. , 2004, pág. 123).

1.2.1.1 Fase preparativa: Pretratamientos del material vegetal para su cultivo in vitro

Consiste en la selección de plantas donadoras que posean características fenotípicas especiales que corresponden con el clon o variedad a propagar, además se realizan tratamientos como la aplicación de desinfectantes, fungicidas y bactericidas a las plantas donadoras, con el objetivo de reducir la contaminación propia del explante y lograr brotes vigorosos y sanos, en estado activo de crecimiento con los cuales iniciar la fase de establecimiento (Pérez J. , 1998, págs. 80-83).

Es extremadamente importante determinar el periodo correcto de tomar explantes, porque se debe tener en cuenta las particularidades fisiológicas de la especie vegetal. En el caso de la *Paulownia*, la introducción de un cultivo estéril se realiza durante la vegetación activa de la planta (Trigo, 2013, págs. 1-2).

1.2.1.2 Fase de establecimiento: iniciación in vitro

Se requiere que los explantes sean transferidos al medio de cultivo de forma aséptica, convenientemente esterilizados, tanto el explante con ayuda de agentes desinfectantes (NaOCl, NaOCl, entre otros) como el medio de cultivo mediante esterilización. Se considera un éxito en esta fase si los explantes sobreviven sin contaminación fúngica ni bacteriana y, se desarrollan satisfactoriamente evitando la oxidación (Sierra de Grado, 2002, págs. 12-13).

Se han desarrollado varios trabajos con *Paulownia*, uno de ellos fue realizado por (Clapa, Fira, Manuela, Vasu, & Buduroi, 2014, págs. 6-14), presentaron un protocolo de iniciación del cultivo *in vitro*, utilizaron yemas axilares y semillas. Aguilar (2001, págs. 1-2), utilizaron fungicidas para la desinfección de *Paulownia tomentosa* logrando obtener brotación de explantes.

Los explantos, o fragmentos de *Paulownia* obtenidos de la planta madre se someten a un proceso de desinfección que suele consistir en un lavado rápido, de un par de segundos, en etanol al 70 - 90%, seguido de unos lavados con agitación en una solución de hipoclorito de sodio u otros desinfectantes con algún agente humectante. Seguidamente, se procede a varios enjuagues en agua destilada para asegurar la desinfección de hongos y bacterias, procedentes de la manipulación y del propio ambiente. Posteriormente se seccionan en fragmentos más pequeños, siempre en condiciones de absoluta asepsia, y se depositan sobre los geles de cultivo en tubos de ensayo y pasan a las incubadoras de ambiente controlado. O bien se procede a seccionar el meristemo de la yema apical para trabajar a partir de él. Los meristemas suelen ser poco viables, pero mejora considerablemente su establecimiento si se incluyen los primeros primordios foliares. En ambos casos, pero especialmente en el segundo, lo que se busca en un principio es la formación de callo (Trigo, 2013, págs. 1-2).

Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro*

La contaminación es uno de los principales y más severos problemas para los micropropagadores de plantas en el mundo, factores tan disímiles como el diseño arquitectónico de los locales de trabajo, la procedencia y edad del explante inicial, la higiene ambiental o la habilidad y preparación técnica de los operarios, entre otros, pueden favorecer o controlar la incidencia de contaminantes microbianos. Como contaminantes frecuentes en el cultivo *in vitro* se menciona a los hongos filamentosos, las bacterias y las levaduras, muchos no son conocidos por provocar daños a las plantas en campo y sin embargo se convierten en patógenos *in vitro*, Herman (1987, págs. 33-35) sugirió el término “vitropatógeno” para nombrarlos (Pérez J. , 1998, pág. 80).

Entre los principales problemas en el cultivo *in vitro* se mencionan:

a) Microorganismos contaminantes

Contaminación endógena o latente

“La contaminación endógena hace referencia a bacterias patógenas o no y a organismos fastidiosos, ya que aparte de ciertos patógenos obligados, los contaminantes fungosos no deben encontrarse latentes en los cultivos *in vitro*” (Pérez J. , 1998, pág. 83).

Contaminantes microbianos introducidos en el laboratorio

Los microorganismos que se introducen en el laboratorio son generalmente habitantes del suelo que se encuentran en el ambiente; saprófitos o patógenos de las plantas, así como habitantes de la microbiota normal del cuerpo humano que se relacionan con procederres inadecuados en el laboratorio, condiciones higiénicas sanitarias deficientes o incumplimiento de la disciplina tecnológica (Pérez J. , 1998, págs. 84-85).

Entre los hongos filamentosos contaminantes, los géneros encontrados con mayor frecuencia han sido *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Neurospora* (Enjalric, Carron, & Lardet (1988, pág. 34), Danby, Epton, Sigeo, &

Leifert, (1994, pág. 32); Álvaro, Herrera, Suárez, Rivero, García, & Acosta, (1997, pág. 56)).

b) Principales fuentes de contaminación

El explante inicial

Los métodos de desinfección utilizados no siempre eliminan las poblaciones de microorganismos asociadas a los tejidos de las plantas *in vivo*, muchos son capaces de permanecer latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores y quedan protegidos de los agentes químicos. De esta forma se introducen en el cultivo de tejidos, se propagan con el material vegetal y pueden manifestarse sobre los medios de cultivo en la fase de establecimiento o permanecer sin expresarse por largos períodos de tiempo (Cassells, 1991, págs. 31-45).

“El tamaño del explante también es una limitante, a mayor tamaño, también son mayores las probabilidades de que los cultivos se contaminen con microorganismos” (EcuRed, 2011, pág. 1).

El ambiente

El ambiente de los locales de trabajo es una fuente de contaminación ya sea directa o indirectamente. A través de las corrientes de aire las partículas de suelo cargadas de esporas y células de microorganismos, son arrastradas y penetran en los locales de trabajo por los acondicionadores de aire, son transportadas e introducidas por el hombre y permanecen en el ambiente por condiciones higiénicas inadecuadas (Pérez J. , 1998, págs. 80-88).

El hombre

El hombre interviene directamente en todas las operaciones que se realizan en el cultivo *in vitro* de plantas y, es una fuente primaria de contaminantes a través del estornudo, la tos, la conversación, entre otros. La presencia de microorganismos contaminantes que son habitantes de la microbiota normal del cuerpo humano como por ejemplo: *Staphylococcus epidermidis* o *Candida albicans*, generalmente indica ineficientes técnicas de asepsia por parte de los operarios (George, 1993, págs. 130-143).

Medio de cultivo e instrumental

La esterilización por el calor húmedo en autoclave se emplea comúnmente para eliminar los microorganismos de los medios de cultivo, ya sea cuando se esteriliza el medio junto con el frasco de cultivo como cuando se prepara, se esteriliza y luego se distribuye. De la calidad de este paso depende en gran medida la continuidad del proceso (Pérez J. , 1998, págs. 80-91).

“Por otra parte, los instrumentos utilizados se esterilizan comúnmente por calor seco o se flamean en alcohol. Precisamente si no se flamean suficiente tiempo, las esporas de *Bacillus* sp. pueden sobrevivir y contaminar los cultivos” (Pérez J. , 1998, pág. 92)

1.2.1.3 Fase de Multiplicación o proliferación in vitro

“El objetivo de la fase de multiplicación, es obtener el mayor número de nuevas yemas en el menor tiempo posible, para ello es importante el control de la tasa de multiplicación del cultivo” (Pérez F. , 2004, pág. 153).

Dependiendo del tipo de explante y de la especie en el cultivo, podemos llevar a cabo diferentes procedimientos de multiplicación de las yemas axilares durante esta fase, las yemas de tamaño adecuado, se podrán separar y cultivar en un nuevo medio, en cambio los racimos de yemas muy pequeñas, deberán sembrarse sin separarse, en un medio nuevo a la espera de un mayor desarrollo para poder aislarlas (Deberhg, 1991, págs. 1-13).

La multiplicación de yemas terminales, axilares o laterales, siendo el punto de inicio meristemas, las puntas de brotes, las yemas, los nudos o los brotes de las yemas en raíces para obtener, mantener y multiplicar los materiales genéticos, e incluso regenerar una planta y estimular la formación de brotes múltiples. Específicamente las ramas axilares y laterales pueden producir ramas adicionales permitiendo subcultivar cada brote para una rápida multiplicación (Roca & Mroginski, 1991, págs. 22-35). Así demuestra Castellanos et al. (2006, págs. 1-12), quienes reportaron la técnica organogénesis indirecta y enraizamiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, obteniendo una alta totipotencia de las células y/o tejidos cercanos a la base, los

cuales incluyeron parte del pecíolo cuando se compararon con el tejido central de la hoja, así, la mayor producción de brotes se obtuvo al utilizar el medio de cultivo MS suplementado con 10 mg/L de BA y 0,5 mg/L de ANA, obteniéndose 1,46 brotes por explante en un término de 30 días.

La tasa de multiplicación es muy importante en términos de eficiencia, es decir, el número de propágulos formados a partir del explante inicial. La misma se efectúa empleando los siguientes sistemas:

- *Sistema convencional in vitro, en medio semisólido.*
- *Sistema de inmersión temporal (SIT), en medio líquido.*

a) Sistema convencional

La micropropagación de plantas, también llamada clonación *in vitro* de plantas en medio semisólido, es una de las herramientas de la biotecnología vegetal que más desarrollo ha mostrado en los últimos años. Ésta permite la producción de un gran número de plántulas a partir de pequeños fragmentos de cualquier tejido vegetal en un tiempo relativamente corto. Es una de las metodologías empleadas en producción *in vitro*, que consiste en colocar el explante, por ejemplo una yema, en un medio de cultivo semisólido, constituido por macronutrientes, micronutrientes, fuentes de hierro, vitaminas, hormonas y agente gelificante; de acuerdo a las necesidades de cada especie. La formulación de medios, incluido el pH, es específica para cada planta y debe ser ajustada según las condiciones de laboratorio (Rojas, García, & Alarcón, 2004, págs. 23-27).

Cuando ya se tiene establecido el protocolo de laboratorio, este sistema presenta con relación a los métodos convencionales *ex vitro* importantes ventajas como: incremento acelerado del número de plantas por cada explante, producción permanente de material (independientemente de la estación del año y las condiciones del clima), mayor control sobre la sanidad del material propagado, facilidad para el transporte del material, posibilidades de multiplicar con rapidez una variedad o ecotipo del cual se posea pocos individuos (Rojas, García, & Alarcón, 2004, págs. 24-30)

La multiplicación de *Paulownia* usando ápices en cultivo *in vitro* convencional es el método más común para la propagación clonal, sin embargo, esta tecnología tiene algunas desventajas: bajos coeficientes de multiplicación, un alto costo por mano de obra, la escasa posibilidad de automatización, lo cual repercute negativamente en el proceso unitario de la planta obtenida a través de este proceso (Becerra, Paredes, Luengo, & Rodón, 2012, págs. 45-60).

b) Sistema de inmersión temporal (SIT)

“La técnica de micropropagación en medio semisólido es más costosa que los métodos tradicionales de producción de plantas y, el uso de biorreactores posibilita la producción masiva de plantas bajando estos costos de producción” (FAO, 2004, pág. 1). De acuerdo a Escalona (1999, págs. 1-2), los SIT, además de mejorar la calidad de las plantas, permiten reducir los costos de mano de obra, aumentan el rendimiento biológico y logran la semiautomatización de los procesos de micropropagación.

El sistema de inmersión temporal, está basado en el contacto intermitente del medio de cultivo líquido con los explantes, por un corto período de tiempo y la consecuente renovación de la atmósfera gaseosa, para evitar la hiperhidricidad de los tejidos y la acumulación de gases tóxicos (EcuRed, 2011, págs. 1-2).

Ventajas del Sistema de Inmersión Temporal.

Disminuye los costos de la mano de obra, debido a la facilidad de manipulación de los explantes y del cambio de medio. Permite una mejor nutrición mineral, por el contacto estrecho entre la superficie de los explantes y el medio durante la fase de inmersión por capilaridad, ya que una fina película de medio se mantiene sobre los explantes. Existe una fuerte disminución de los problemas de asfixia o vitrificación de los tejidos en comparación con una inmersión permanente, ya que permite una renovación completa del aire dentro del recipiente durante cada inmersión. También permite una mejor separación de los tejidos o células bajo el efecto de las burbujas y mayor control de los procesos morfológicos debido a la frecuencia de las inmersiones. Permite la protección de cada recipiente contra la contaminación por medio del uso de filtros, además la manipulación individual es fácil y anula los riesgos de contaminación cruzada (González K. , 2003, págs. 10-15).

Principales limitantes de la multiplicación en biorreactores

Vitrificación

Hiperhidricidad o vitrificación es el término propuesto para definir las malformaciones que frecuentemente se observan en plantas herbáceas y leñosas que se cultivan *in vitro* este fenómeno puede ocurrir por las altas concentraciones de citoquininas, alta humedad relativa en el recipiente de cultivo, recipientes herméticos, entre otras causas (Debergh, Aitken, Cohen, Von, Zimmerman, & Ziv, 1992, págs. 135–140).

Estrés oxidativo

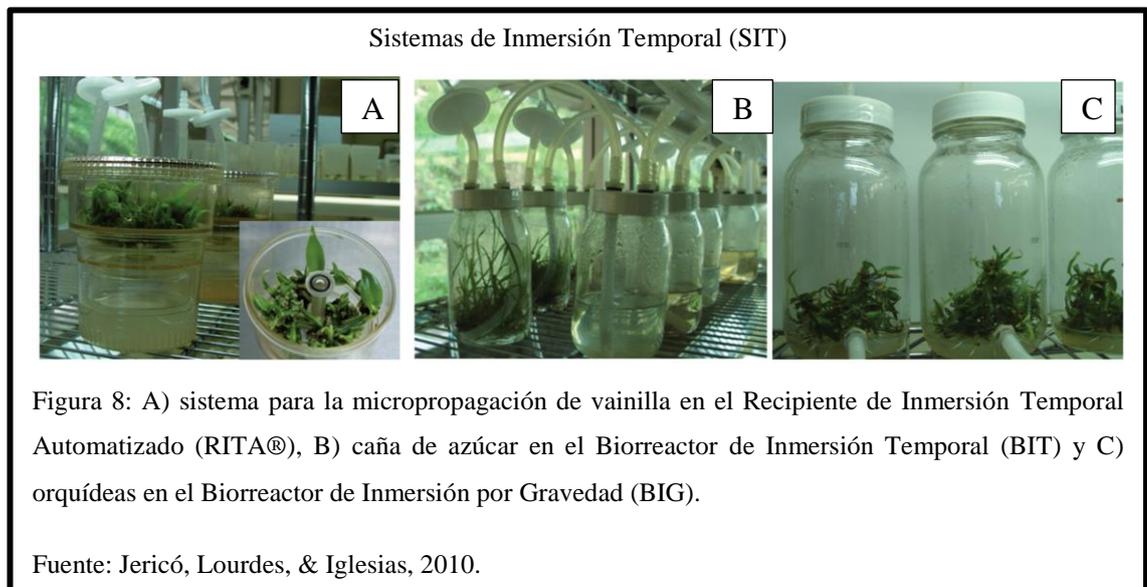
La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño incluso la muerte celular (Amiot, Forget, & Goupy, 1996, págs. 237-247).

Usos de los Sistemas de Inmersión Temporal

Los Sistemas de Inmersión Temporal han sido utilizados exitosamente en diferentes especies de plantas cultivadas, entre ellas: plátanos, bananos, cítricos, café, piña, papa, malanga, yuca, ñame, papaya, camote, entre otros; respecto a las distintas técnicas de cultivo de tejidos como proliferación de meristemos, desarrollo de embriones a partir de callos, germinación y conversión de embriones somáticos a planta, entre otros (EcuRed, 2011, págs. 1-2). Actualmente, se están realizando trabajos en las especies del género *Paulownia*, mediante la propagación masiva bajo el sistema de inmersión temporal, aunque todavía no se reportan protocolos que demuestren la tecnología empleada. Becerra, Paredes, Luengo, & Rodón (2012, págs. 45-60), afirman que las plantas de *Paulownia* se propagan por medio del SIT y que las plántulas presentan un mayor vigor y tamaño superior en un 30%, comparadas con la multiplicadas bajo el sistema convencional *in vitro*, de la misma manera se observa un porcentaje menor al 1% de hiperhidratación, con un costo de producción inferior en un 20%.

Tipos de Sistemas de Inmersión Temporal

De acuerdo al instituto de Biotecnología y Ecología aplicada (INBIOTECA), de la Universidad Veracruzana, los SIT pueden ser de tres tipos: el recipiente de inmersión temporal automatizado (RITA[®]), el biorreactor de inmersión temporal (BIT) y el biorreactor de inmersión por gravedad (BIG) (Escalona, y otros, 1999, págs. 743-748), detallados a continuación, como se muestra en la figura a continuación.



Recipiente de inmersión temporal automatizado (RITA):

Dentro de los sistemas de inmersión temporal, se destaca el RITA[®], el cual está compuesto por un solo frasco con dos compartimentos, uno superior en donde se encuentran las plantas y uno inferior donde se deposita el medio de cultivo. Al inyectar aire con una bomba al compartimento inferior el medio de cultivo es impulsado hacia el que contiene las plantas, quedando estas inmersas en el medio líquido el tiempo que dure la inyección de aire (Etienne & Berthouly, 2005, págs. 215-231). Su funcionamiento se describe en la figura 9.

Esquema de un biorreactor tipo RITA®

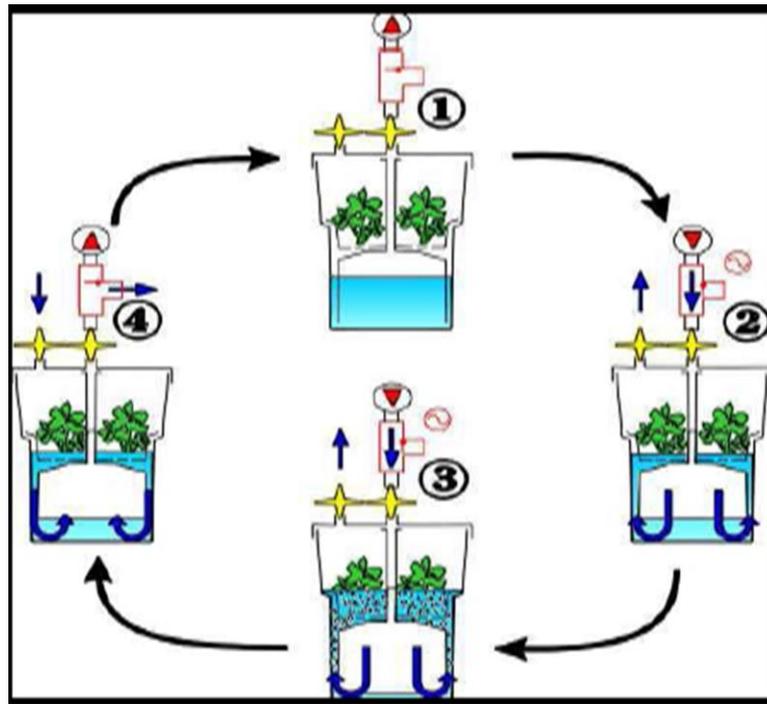


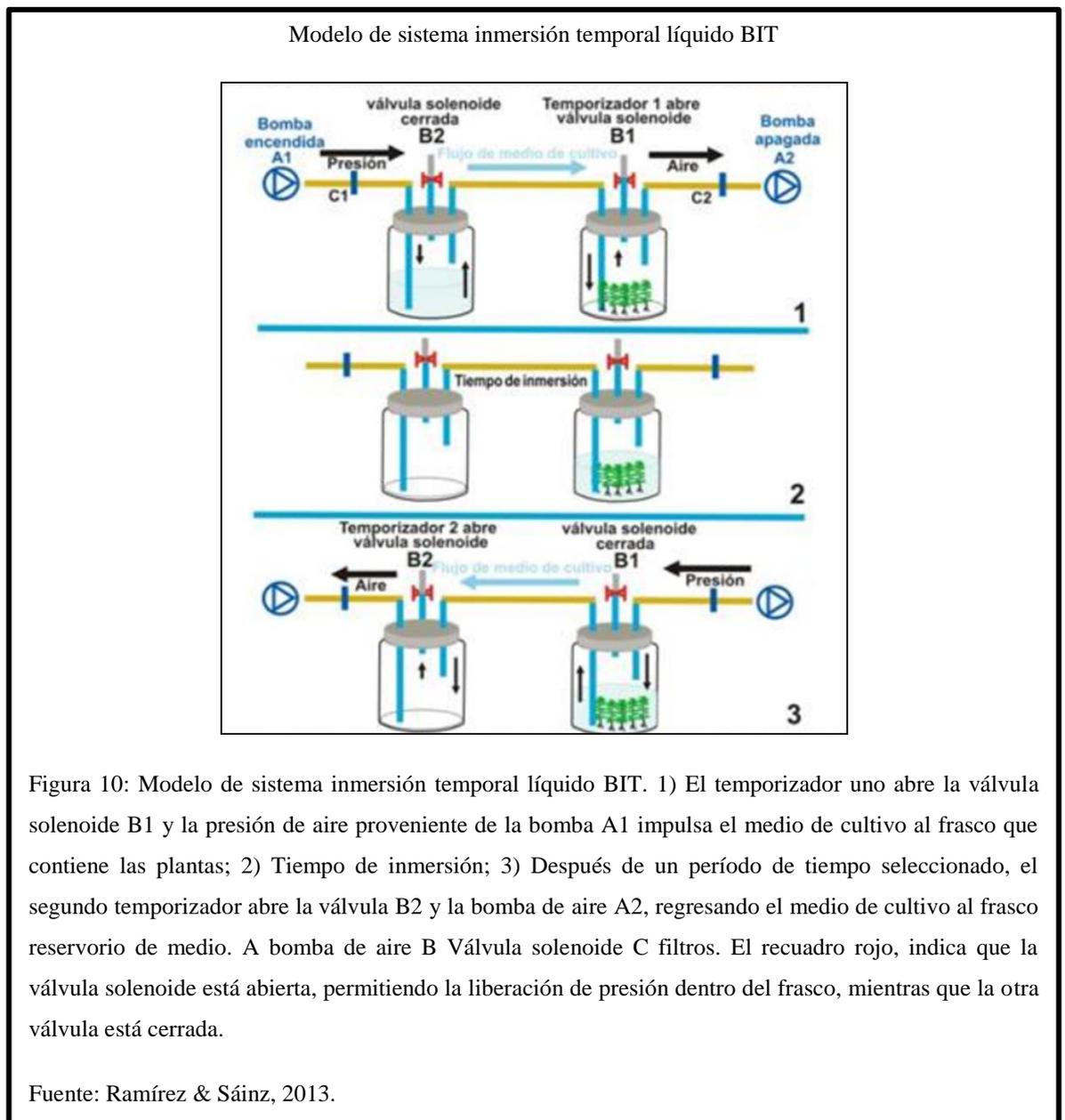
Figura 9: Biorreactor en estado de reposo (1); comienza a ingresar aire al sistema (2); plantas inmersas en el medio de cultivo (3); el medio de cultivo desciende por gravedad a la recámara inferior (4).

Fuente: Etienne & Berthouly, 2002, pág. 217

Biorreactor de inmersión temporal (BIT)

Como se muestra en la figura 10, está formado por dos frascos de cultivo, que pueden ser de plástico o de vidrio, uno para el crecimiento de los explantes y el otro como reservorio de medio de cultivo. Estos frascos están conectados entre sí por una manguera de silicona de 6 mm de diámetro mediante conectores que atraviesan la tapa. En la parte interna de la misma se coloca una manguera menos flexible, la cual desciende hasta el fondo en ambos recipientes. El medio de cultivo circula de un frasco a otro en dependencia de la apertura o cierre de las electroválvulas, las cuales están conectadas a un temporizador programable para la determinación de la frecuencia y la duración de la inmersión. A la entrada de los frascos se colocaron filtros hidrófobos ($0,22 \mu\text{m}$) para garantizar la esterilidad y la presión de aire, ésta es regulada por un manómetro. Además, posee un compresor de aire con encendido

automático que garantiza la disponibilidad del mismo (Escalona, y otros, 1998, págs. 743-748).



Biorreactor de inmersión por gravedad (BIG)

El sistema BIG es utilizado actualmente por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, tiene entre otras ventajas: bajo costo, capacidad variable, uso de una sola válvula solenoide como se observa en la figura 11, permitiendo con ello disminuir los gastos de inversión y electricidad del sistema neumático (Ramírez & Sáinz, 2013, pág. 1).



1.2.1.4 Fase de enraizamiento in vitro

Cada brote, esqueje o yema de forma individual que se ha formado en la fase de multiplicación, debe ser cultivada y manipulada *in vitro* cambiando el balance hormonal, aumentando la concentración de auxinas y disminuyendo la concentración de citoquininas, para que además de crecer y desarrollar sus estructuras aéreas, desarrolle varias raíces que le permitan absorber los nutrientes al trasplantarse a un sustrato enriquecido (Pérez J. , 1998, págs. 391-393).

Bergmann & Moon (1997, págs. 315-317) ; Corredoira, Cernadas, & San (2010, págs. 5-22); Lobna, Ibrahim, & Farahat (2008, págs. 594-600); Rout, Reddy, & Das (2001, págs. 208-212); llevaron a cabo enraizamiento *in vitro* y la posterior aclimatación *ex vitro* obteniendo plantas del género *Paulownia* para el campo.

Castellanos, Rodríguez, Rodríguez, & Rodríguez (2006, págs. 1-12), lograron un protocolo de enraizamiento eficiente. En este trabajo también se incluyó experimentación para la producción de raíces, para la inducción se utilizaron brotes provenientes de la proliferación de yemas axilares, se seleccionó aquellos con un porte aproximado de 2 cm, se estableció un experimento para estudiar el efecto de

diferentes agentes enraizadores: medio M&S libre de reguladores de crecimiento bajo luz blanca, medio M&S libre de reguladores de crecimiento expuesto a luz roja (660 nm), medio M&S libre de reguladores de crecimiento con infección de *Agrobacterium rhizogenes* y medio M&S suplementado con 1,5 mg/L de IBA, los brotes se cultivaron en contenedores de plástico de un litro de capacidad enriquecidos con 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar y ajustado a pH $5,8 \pm 0,02$ antes de ser esterilizados en autoclave. Obtuvieron mejores resultados en el tratamiento utilizando 1,5 mg/L de AIB mejorando el proceso de diferenciación de raíces adventicias en brotes de *Paulownia elongata*, en cuanto al número de raíces, altura de la planta y número de hojas.

1.2.1.5 Fase de aclimatación de la vitroplanta

Ésta es la fase más difícil del cultivo, cuando las plántulas salen del ambiente estéril y rico en nutrientes del tubo de ensayo para iniciar su desarrollo en tierra. Se requiere de condiciones adecuadas y grandes cuidados para que las plántulas no mueran por pérdida excesiva de agua o por ataque de patógenos (García, Quintero, & López, 2004, págs. 34-37).

Al ser sacadas del contenedor o tubo de ensayo, deben ser limpiadas de todo vestigio del medio de cultivo con agua tibia y sumergidas en una solución de fungicida sistémico, pues pueden ser una fuente de contaminación; se colocan en vasos o macetas de 250 cc, en una mezcla balanceada de suelo, arena y material inerte estéril, almacenadas en un invernadero bajo condiciones de humedad constante y baja radiación solar. Se requiere durante los tres primeros días, de un ambiente cercano al 95% de humedad relativa y 40% de exposición a la luz. Al cabo de unos días una vez endurecidas deben ser aclimatadas, por lo que se trasplantan a un nuevo sustrato con suelo, arena y materia orgánica en condiciones de vivero (Rojas, García, & Alarcón, 2004, págs. 35-45).

Mediante un apropiado proceso de aclimatación, las plantas micropropagadas de *Paulownia* logran sobrevivir a condiciones *ex vitro* después del trasplante, un sistema radicular funcional y adecuado en las plantas garantiza no sólo su supervivencia, sino su desarrollo apropiado durante y después de la etapa de

aclimatación en invernadero, en vivero y posterior en el campo (Castellanos, Rodríguez, Rodríguez, & Rodríguez, 2006, págs. 1-12).

1.2.2 Factores que influyen en la micropropagación

Existen diferentes factores que determinan el éxito o fracaso al momento de realizar la micropropagación, entre estos se encuentran:

1.2.2.1 Planta que dona el explante

“La edad y el estado fisiológico de la planta que dona el explante (planta madre) influye significativamente en su capacidad morfogénica. Los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas en diferentes edades fisiológicas” (Villalobos, 1982, pág. 34).

El estado fitosanitario de la planta madre influye también en el establecimiento de un cultivo *in vitro*. Si se debe elegir entre individuos de un mismo clon, se debe tomar los más sanos como material experimental, ya que esto repercute sobre el porcentaje de infección después del aislamiento (Pierik, 1990, págs. 65-67).

1.2.2.2 Tipo y edad del explante

En caso de que la fuente del material vegetal sea de una planta de edad adulta, existen otras variables a considerarse como: presencia de fitopatógenos, productividad agrícola así como vigorosidad, es por esto que se emplea de preferencia material vegetal juvenil, ya que la dediferenciación y multiplicación de dichos tejidos se desarrolla de manera más acelerada y sencilla (Pérez J. , 1998, págs. 65-67).

Es un aspecto de gran influencia en la morfogénesis. Como regla general se puede decir que cuando más joven e indiferenciado se encuentre el explante a cultivar, mejor será su respuesta *in vitro*. Es por ello que los meristemas apicales y axilares son ampliamente usados en numerosas especies. En el caso de la micropropagación de plantas leñosas, la edad del explante es un factor crítico (Roca & Mroginski, 1991, págs. 22-35).

Ipekci, Atinkut, Kazan, Bajrovic, & Gozukirmizi (2001, págs. 113-115), obtuvieron una regeneración a partir de meristemos axilares de los explantes nodales para *Paulownia elongata* ; Burger, Liu, & Wu (1985, págs. 760-761), trabajaron con segmentos de tallo con un nodo de *P. tomentosa*.

1.2.2.3 Factores físicos que influyen en el desarrollo in vitro de una planta

Los factores físicos son principalmente la luz (intensidad y fotoperiodo), la temperatura y la humedad relativa (Villalobos, 1982, págs. 155-164).

Luz: La intensidad puede variar en dependencia del fenómeno morfogénico que se busca, de forma general la intensidad usada se sitúa entre 5 y 25 w/m² o sea 1000-5000 lux. Con respecto al fotoperiodo este será distinto dependiendo del tipo de cultivo con el que se esté trabajando. Generalmente se eligen días de 14 - 16 horas luz o 14/10 y 16/8 (Pierik, 1990, págs. 2-8).

Temperatura: la temperatura se mantiene generalmente constante de 24 a 26 °C. A veces, dependiendo de la especie experimental, se elige una temperatura más baja (18 °C para las especies bulbosas), o una temperatura más alta (28 - 29 °C para las especies tropicales). La temperatura óptima para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, es generalmente 3 - 4 °C más alta que la correspondiente para el crecimiento *in vivo* (Pierik, 1990, págs. 23-29).

Humedad relativa: teniendo en cuenta que la humedad dentro del recipiente de cultivo es alta de 80-100% (debido al efecto invernadero que crean las paredes del plástico o vidrio del recipiente), la humedad del cuarto de crecimiento probablemente sólo influirá en la pérdida de agua desde el frasco de cultivo. Sin embargo, una elevada humedad en el cuarto produce como resultado una mayor cantidad de infecciones (Chee & Pool, 1982, págs. 17-27). El promedio óptimo varía entre 60 y 70%.

1.2.2.4 Medios de cultivo

Medio de cultivo semisólido

La técnica tradicional del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* utiliza medios de cultivo semisólidos. En este sistema cada brote se mantiene en frascos individuales, los cuales se transfieren manualmente cada veinte o treinta días para evitar la alteración de las concentraciones de los nutrientes y el crecimiento excesivo de los brotes (Jones, 2006, págs. 14 – 18).

Pese a su uso extensivo, el cultivo de tejidos vegetales en medio semisólido posee una serie de desventajas, conlleva gastos en mano de obra entre 65 % y 85 % del total de costos del proceso debido a la necesidad de mantener gran cantidad de frascos y un número importante de personal para la preparación periódica de medios de cultivo y el manejo de los brotes. Además, los gelificantes representan un componente del medio de cultivo de alto costo (Eide, Munster, Heyerdahl, & Lyngved, 2003, págs. 1-2).

Para trabajos con *Paulownia* el medio de cultivo o medio basal, ha de contener todos los nutrientes que la planta necesita para crecer sin raíces y determinados reguladores de crecimiento. Se suele utilizar la fórmula de Murashige y Skoog (MS), aunque también existen otras más modernas como la de Gamborg (B5) o la WPM, con menor concentración de sales. A estas sales, tanto de macronutrientes, como de micronutrientes, se les añade sacarosa como fuente de carbohidratos, vitaminas del grupo B (principalmente B1, pero también B3, B5 y B6), aminoácidos (la L-glutamina es útil en cultivos de callos, aunque también se pueden adicionar otros aminoácidos esenciales), reguladores de crecimiento y un gelificante como el agar o la Gelrite (Trigo, 2013, págs. 1-2).

Medio de cultivo líquido

La utilización de este método da como resultado mayores tasas de crecimiento que en medios semisólidos, debido a la mayor superficie de contacto del explante con el medio y a las menores gradientes de difusión entre el medio y el explante, lo cual facilita la absorción de nutrientes. Sin embargo, la inmersión continua de los tejidos

provoca síntomas de estrés por oxidación e hiperhidratación (Damiano, Gentile, La Starza, Frattarelli, & Monticelli, 2003, págs. 359 - 364).

El empleo de los medios de cultivo líquidos en el cultivo *in vitro* es un aspecto primordial en la automatización de la micropropagación y en el desarrollo de técnicas para la producción a gran escala (Aitken-Christie, KozaiT, & Takayama, 1995, págs. 24 -32).

Los explantes necesitan de varios componentes orgánicos e inorgánicos que provean los nutrientes para su crecimiento *in vitro*, los mismos que se pueden observar en la tabla 2, dependiendo del objetivo a perseguir.

Tabla 2

Conjunto de sustancias que se añaden a los medios de cultivo para inducir el crecimiento y desarrollo

Necesidades nutricionales y hormonales de los cultivos de órganos y tejidos vegetales
Reguladores de crecimiento: Auxinas, Citoquininas, Giberelinas, Ácido abscísico, Etileno
Macroelementos: N, P, K, Ca, Mg, S
Microelementos: Fe, Co, Zn, Ni, Mn, Cu, I, Mo
Azúcares
Aminoácidos
Agua
Mezclas de sustancias poco definidas: Extracto de levadura leche de coco extractos vegetales hidrolizados de caseína peptona y triptona

Nota: Pierik, 1990

Dentro de los componentes principales de un medio de cultivo se encuentran:

a) Fuentes de carbono

Son sustancias orgánicas como los azúcares que proveen tres de los elementos mayores esenciales: hidrógeno, carbono y oxígeno. Los azúcares son producto de la fotosíntesis, sin embargo las plantas que crecen *in vitro*, debido a la baja intensidad lumínica, no pueden fabricar todo el azúcar que requieren, por lo

que se adicionan altas concentraciones de 2 a 5 % de sacarosa al medio de cultivo (Albdelnour- Esquivel & Escalant, 1994, pág. 12).

b) Agua

“Es el componente con mayor cantidad en el medio de cultivo, constituye el 95% del medio, se recomienda usar agua destilada, bidestilada y desionizada” (Guerra & Nodari, 2004, pág. 1).

c) Sales Minerales

Los elementos necesarios para el crecimiento y desarrollo de una planta completa deben ser suministrados en un medio de cultivo para el crecimiento y desarrollo de los tejidos y órganos cultivados *in vitro*.

Las sales minerales se pueden dividir en:

Macro-elementos: son compuestos químicos que la planta requiere en grandes cantidades como el nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S). Las concentraciones así como el tipo de sales utilizadas varían según el tipo de medio de cultivo utilizado, en la tabla 3, se muestran los medios de cultivo más utilizados *in vitro* (Pérez F. , 2004, págs. 45-46).

Micro-elementos: son nutrientes esenciales que se encuentran en bajas concentraciones en las plantas, en ocasiones un aumento de alguno de estos componentes puede causar toxicidad en los tejidos. La mayor parte de ellos corresponden a constituyentes enzimáticos, de biomoléculas estructurales, como proteínas, lípidos o carbohidratos (CIAT, 1991, págs. 20-22). Según Pérez (2004, pág. 47), los principales micronutrientes son el zinc (Zn), molibdeno (Mo), cobre (Cu), boro (B), manganeso (Mn), cobalto (Co) y hierro (Fe), la disponibilidad del hierro se reduce por la precipitación de este compuesto cuando el pH del medio de cultivo aumenta afectando el crecimiento de los explantes *in vitro*.

Tabla 3

Componentes de algunos medios de cultivo *in vitro* más utilizados

Macronutrientes (mg/L)			
Componentes	Medio MS	Medio SH	Medio WPM
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	200	72,5
Ca(NO ₃) ₂ .2H ₂ O	-	-	471,26
KH ₂ PO ₄	170	-	170
KNO ₃	1900	2500	-
K ₂ SO ₄	-	-	990
MgSO ₄ .7H ₂ O	125	400	180,54
NH ₄ NO ₃	1650	-	400
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	300	-
Micronutrientes (mg/L)			
Componentes	Medio MS	Medio SH	Medio WPM
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,1	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,2	0,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	15	27,8
H ₃ BO ₃	6,2	5	6,2
KI	0,83	1	-
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	13,2	22,3
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,1	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	1	8,6
Na ₂ EDTA	37	20	37,3
Vitaminas y aminoácidos (mg/L)			
Componentes	Medio MS	Medio SH	Medio WPM
Glicina	2	-	2
Mio-inositol	100	100	100
Ácido nicotínico	0,5	5	0,5
Piridoxina HCl	0,5	0,5	0,5
Tiamina HCl	0,1	5	1

Medio MS: medio de MURASHIGE & SKOOG (1962)

Medio SH: medio de SCHENK & HILDEBRANDT (1972)

Medio WPM: medio de LLOYD & McCOWN (1981)

Nota: Pérez, 2014

d) Vitaminas y aminoácidos

“Las vitaminas favorecen el cultivo de tejidos *in vitro* y la ausencia de alguna de ellas puede ser un limitante en el desarrollo organogénico de ciertos explantes” (Aleján, 2000, pág. 1). “La tiamina especialmente, es ampliamente empleada para algunas especies en concentraciones de 0,1 a 5 mg/L. Otras vitaminas como el ácido nicotínico, glicina, biotina y piridoxina son añadidos al medio de cultivo con la

finalidad de mejorar la respuesta celular” (Smith, 2000, pág. 34). “El mioinositol, en concentraciones de 50 a 500 mg/L potencializa la activación de la organogénesis” (Alemán, 2000, pág. 1). “Mientras que a pesar de que el ácido ascórbico y el ácido cítrico se encuentran en el grupo de las vitaminas, son empleadas en medios de cultivo como antioxidantes evitando así el oscurecimiento de los tejidos” (Pierik, 1990, pág. 67).

e) Agentes gelificantes

Se utilizan para darle una apariencia semisólida o sólida al medio de cultivo, para permitir que los explantes se mantengan en una posición fija. Entre los agentes gelificantes más utilizados se encuentra el agar que es un polisacárido de elevado peso molecular que se obtiene de algas marinas, la agarosa que es un agar de mayor pureza empleado en el cultivo de células aisladas y protoplastos, el gelrite y phytagel son gelificantes de alta calidad y pureza, se emplea en menor concentración que los otros gelificadores (Pérez F. , 2004, págs. 16-18).

f) Reguladores de crecimiento

“Las hormonas vegetales o fitohormonas son aquellas sustancias sintetizadas en un determinado lugar de la planta y que se translocan a otro donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento, desarrollo, reproducción y otras funciones de las plantas” (Rojas, García, & Alarcón, 2004, pág. 89). A continuación se detallan los principales:

Auxinas

Las auxinas son el grupo de reguladores de crecimiento más conocido, derivadas del aminoácido triptófano que se sintetizan en los ápices de los brotes y en las raíces y se transportan por medio del floema. Cuando se adicionan en cantidades adecuadas, pueden regular la elongación celular, la división celular, la formación de raíces adventicias y puede inducir a la embriogénesis. También, son las responsables de los tropismos. Las auxinas más utilizadas en los medios de cultivo vegetales pueden ser sintéticas como el ácido indol butírico (AIB), ácido naftalen acético (ANA), 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D); o naturales como el ácido indol acético (AIA) y sus derivados como el ácido fenil acético (Rivero, 2011, págs. 50-55).

Citoquininas

Las citoquininas son sustancias derivadas de las purinas que se sintetizan en los meristemos apicales de la raíz, hojas en desarrollo y en embriones jóvenes y se transportan a los brotes a través del xilema. Pueden regular la división celular, estimular la formación de brotes axilares y adventicios, regular la diferenciación, inhibir la formación de raíces y estimular la actividad de enzimas y proteínas (Jácome, 2011, págs. 23-24)

“También, regulan la formación y desarrollo del tallo. Pueden regular la síntesis de pigmentos fotosintéticos, detienen la caída de hojas, retrasan el envejecimiento y la muerte de órganos” (Lozano, 2011, pág. 78).

“Las citoquininas más utilizadas son sintéticas, como la kinetina (KIN) y la 6 bencilaminopurina (BAP), una de las citoquininas más activas; o naturales como la zeatina (ZEA) y la isopentiladenina (2iP)” (Jácome, 2011, pág. 25).

El equilibrio entre las auxinas y las citoquininas rigen la diferenciación de un tejido *in vitro*. Así, al mantener más concentración de auxinas predominará la formación de raíces y, por el contrario, si se mantienen altas las concentraciones de citoquininas respecto a las auxinas, se dará lugar a la formación de brotes (Marín & Moll, 1997, pág. 34). Como lo reportaron Ipecki et al. (2001, págs. 113-115) quienes usaron un medio de cultivo M&S suplementado con 1 mg/L de BAP y 0,1 mg/L ANA y lograron obtener un 100% de regeneración de *Paulownia*.

Giberelinas

Las giberelinas se forman por diterpenos y son utilizadas raramente en el cultivo de tejidos. Son producidas en los ápices de los tallos y son conducidos por medio del floema. Se utilizan para promover la floración, romper la dormancia de semillas, yemas y bulbos; y para la elongación celular. Por lo general inhiben la formación de raíces y vástagos adventicios. Pueden inducir la actividad del cambium en algunos árboles de climas templados para que broten en primavera. También, son responsables de la geminación de semillas, ya que cuando éstas toman agua estimulan la acción de la amilasa que forma la glucosa, su aumento provoca la

síntesis de giberelina y el consecuente desarrollo de un embrión para dar lugar a una nueva planta (Rivero, 2011, págs. 65-66).

“Las giberelinas más comunes son AG₁, AG₃, AG₄, AG₇ y AG₉” (Jácome, 2011, pág. 82)

Etileno y ácido abscísico

“El etileno estimula la maduración de frutos y la senescencia de flores y hojas. También promueve el crecimiento lateral, importante durante la germinación aunque reduce la velocidad de elongación de las células” (Rivero, 2011, pág. 78).

El ácido abscísico (ABA) en la mayoría de los casos, produce un efecto negativo en el cultivo de tejidos ya que puede inhibir la acción de las auxinas, giberelinas y citoquininas; actuando como una defensa natural contra el estrés fisiológico. Esto se puede dar debido a que su acción provoca el cierre de estomas. En algunos casos promueve la maduración de embriones y cuando se realizan suspensiones facilita la sincronización celular (Recalde, 2007, págs. 42-44).

1.2.3 Métodos de propagación *in vitro*

Dentro de las técnicas de cultivo *in vitro* utilizadas en el género *Paulownia* se han reportado la organogénesis y embriogénesis, directa e indirecta; de éstas, la organogénesis directa es la técnica que comúnmente se emplea para la propagación masiva comercial, mientras que la embriogénesis somática se maneja más en protocolos de mejoramiento genético.

1.2.3.1 Organogénesis directa

Respuesta morfogénica por la cual se forman directamente órganos (organogénesis) o embriones sin pasar por la fase de callo (Roca & Mroginski, 1991, págs. 22-35).

Es decir es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía formación de primordios de raíces y el subsecuente enraizamiento final (EcuRed, 2011, págs. 1-2).

La organogénesis ha sido la base fundamental de la multiplicación vegetativa y dentro de ella pueden diferenciarse dos vías: la formación de yemas axilares y la formación de yemas adventicias. Los tejidos usados de manera frecuente como explantes para la multiplicación clonal son los ápices o yemas axilares, como se ha realizado en la propagación de *P. catalpifolia* (Song, Sato, Ishii, Saito, & Ohba, 1990, págs. 495-498), y *P. fortunei* (Seem.) Hemsl. (Sharma, Charan, & Dihman, 2003, págs. 276-280).

En *P. tomentosa* fue posible formar brotes a partir de segmentos nodales en medio M&S con una combinación de 4,4 mg/L de BA y 1,4 mg/L de ANA, logrando obtener un total de 81 plántulas por cada explante después de 12 semanas (Rout, Reddy, & Das, 2001, págs. 208-212). En ese mismo sentido se generó brotes a partir de segmentos foliares en *P. kawakami*, con condiciones similares a las encontradas en *P. tomentosa* (Low, Prakash, Swarup, & Kumar, 2001, págs. 696-700).

Formación de yemas axilares.

Esta técnica se basa en la formación de brotes a partir de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas y primordios de las hojas, los cuales son divididos o subcultivados respectivamente. Este método a pesar de no ser el más rápido, ha sido el más utilizado para la propagación comercial debido en primer lugar a la facilidad con que se ha establecido en la mayoría de las especies y en segundo lugar a la estabilidad genética de las plantas regeneradas, siendo el sistema de regeneración en el cual se reportan los menores índices de variación genética (Pérez J. , 1998, págs. 23-45).

La principal desventaja radica en la laboriosidad del proceso, lo cual implica altos costos por mano de obra, bajos coeficientes de multiplicación en comparación con otros sistemas de regeneración y escasa posibilidad de automatización del proceso productivo. No obstante existen posibilidades de automatizar algunas etapas del proceso con la utilización de biorreactores y sistemas de inmersión temporal (EcuRed, 2011, págs. 1-2).

Formación de yemas adventicias.

Es la formación de *novo* de yemas a partir de meristemos preexistentes o tejido no meristemático, las cuales se originan de una o de un pequeño grupo de células, cuando se cultivan los explantes en medios de concentraciones elevadas de citoquininas (EcuRed, 2011, págs. 1-2).

Con esta técnica es posible producir un mayor número de plantas por unidad de tiempo en comparación con el método de yemas axilares y a la vez presenta mayores posibilidades de mecanización automatización, existiendo ya varios ejemplos de utilización de biorreactores para su producción. Sin embargo, al igual que el método de yemas axilares tiene la limitante de que el proceso productivo es realizado en dos etapas: producción de brotes y crecimiento-enraizamiento. Adicionalmente presenta el inconveniente de que puede ser una fuente de variación genética debido al propio origen unicelular de las yemas adventicias. Este método ha tenido su mayor aplicación en la propagación de plantas ornamentales donde la ocurrencia de plantas fuera de tipo no es un problema (Pérez J. , 1998, págs. 45-87).

1.2.3.2 Organogénesis indirecta

Tras una desdiferenciación celular, acompañada de crecimiento tumoral dando lugar a una masa de células indiferenciadas denominada callo, se puede generar órganos o embriones bajo las condiciones adecuadas, específicamente con un balance hormonal que induzca la formación de brotes o raíces (Roca & Mroginski, 1991, págs. 22-35).

Kumar, Rao, & Goh (1998, págs. 886-890), reportaron que en *Paulownia fortunei* el mayor número de células competentes para la regeneración de brotes están localizadas en la base del pecíolo, y depende de la totipotencia y de algunos otros factores que influyen la alta vascularidad y niveles de fitohormonas y metabolitos.

1.2.3.3 Embriogénesis somática

Terminología utilizada por Tokin en 1963 para describir la formación de un individuo a partir de una o varias células somáticas, es decir que no es el producto de la fusión de gametos. Sin embargo, este fenómeno no debe confundirse con organogénesis. Los embriones somáticos son estructuras bipolares con un eje radical apical y no poseen conexiones vasculares con el tejido materno, dicha estructura es

capaz de crecer y formar una planta completa. Puede ser directa o indirecta, ya que puede acompañarse de un fenómeno de callogénesis (Abdelnour & Vincent, 1994, págs. 27-39).

Para este tipo de reproducción asexual se pueden utilizar diversos tejidos con objetivos distintos, como por ejemplo, los segmentos foliares e internodales usados como explantes para embriogénesis somática indirecta, en *P. elongata* se ha documentado la obtención de un promedio de 50,7 embriones somáticos por cada 100 mg de callo embriogénico, mediante la combinación de los reguladores de crecimiento TDZ y kinetina, después de cuatro semanas de cultivo (Ipekci & Gozukirmizi, 2003, págs. 16-24). Por otra parte Song, Sato, Ishii, Saito, & Ohba (1990, págs. 495-498), usaron segmentos de hoja y de peciolo para desarrollar embriones de *P. catalpifolia* Steud., con más de 65% de explantes que formaron callo, después de cuatro semanas. De manera similar, se han empleado pecíolos y segmentos foliares para la regeneración de brotes adventicios en otras especies maderables como sándalo (*Santalum album* L) (Rao, Goh, & Kumar, 1993, págs. 72-76). Estos mismos investigadores continuaron con la línea de embriogénesis somática pero de forma directa lograron generar no solamente embriones, sino semillas sintéticas a través del encapsulamiento de los embriones en una solución de 3% de alginato de potasio, una vez encapsulados fueron evaluados periodos de almacenamiento a 4°C por 30 y 60 días, encontrando frecuencias de germinación de 73,7% y 53,3%, respectivamente (Ipekci & Gozukirmizi, 2003, págs. 16-24).

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Localización del estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento Nacional de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina, del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ubicado en la Provincia de Pichincha, Cantón Mejía, Parroquia Cutuglahua. Las condiciones se describen en la tabla 4.

Tabla 4

Condiciones del sitio experimental

Altitud	2400 - 3500 msnm
Latitud	00°22'12" S
Longitud	78° 32'20" W
Temperatura promedio anual	11,6 °C
Precipitación promedio anual	1400 mm
Humedad relativa	79 %

Nota: (INAMHI, 2014)

2.2 Condiciones del cultivo

Las plantas madre sembradas fueron 15 pertenecientes para la especie *Paulownia elongata*, 15 *Paulownia fortunei* y 15 *Paulownia* híbrida, se mantuvieron a una temperatura de 25 ± 2 °C y 80% de humedad relativa y se regaron dos veces por semana con 100 mL/planta, con agua potable.

Plantas del género *Paulownia* mantenidas en el invernadero del laboratorio de Cultivo de Tejidos del Programa Nacional de Biotecnología del INIAP



Figura 12

Elaborado por: Cárdenas, 2014.

Para las fases de cultivo *in vitro*, el material introducido de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido, se colocó en estanterías metálicas en un cuarto de crecimiento en condiciones controladas, a una temperatura de $25-28 \pm 1$ °C, 40-60% de humedad y un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad con una intensidad lumínica de aproximadamente 2000 luxes.

Cuarto de cultivo cálido



Figura 13

Elaborado por: Cárdenas, 2014

2.3 Materiales

2.3.1 Material vegetal

Para la investigación se utilizaron dos especies *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) que fueron importados de Georgia, USA (figura 14).



Las plantas se llevaron para su adaptación al invernadero del Departamento Nacional de Biotecnología del Santa Catalina del INIAP para sus respectivos cuidados, donde se colocaron en fundas de siembra con una mezcla de tierra y turba previamente esterilizada con una solución de Benlate 1g/L de agua. Además, se realizó un control fitosanitario a nivel de hojas con una aplicación de Carbendazin cada 8 días para prevenir la contaminación durante la fase de establecimiento.

2.3.2 Materiales de laboratorio

- Marcadores
- Atomizadores
- Cinta de autoclavable
- Cinta masking
- Cinta rolopac
- Erlenmeyers

- Fósforos
- Frascos de vidrio con tapa rosca
- Guantes de nitrilo
- Jeringuillas 1, 5 y 10 ml
- Mandil
- Mascarilla
- Cajas Petri
- Vasos de precipitación
- Espátulas
- Materiales de disección (mango de bisturí Nro. 11, pinzas y hojas de bisturí Nro. 11)
- Mechero de alcohol
- Papel absorbente
- Papel aluminio
- Papel bond estéril
- Piceta 200 ml
- Probeta
- Tijeras
- Servilletas estériles
- Tubos de ensayo con tapa

2.3.3 Equipos de laboratorio

- Agitadores magnéticos
- Autoclaves
- Balanza de precisión
- Cámaras de flujo laminar vertical
- Cuarto de crecimiento SIT
- Destilador de agua
- Dispensador de medios
- Microondas
- pH-metro
- Refrigeradores

- Calefactor
- Humidificador

2.3.4 Reactivos

- 6-Bencilaminopurina (BAP)
- Biorreactores de Inmersión Temporal
- Ácido naftalenacético (ANA)
- Ácido indol-3-acético (AIA)
- Ácido indol butírico (IBA)
- Agar
- Alcohol potable
- Benomil
- Hipoclorito de sodio
- Jabón líquido
- Povidyn
- Medio Murashige y Skoog (M&S)
- Tween-20
- Phytton
- Ácido ascórbico
- Hidróxido de sodio

2.3.5 Equipos y material de oficina

- Cámara de fotos
- Computador
- Impresora
- Resmas de papel bond

2.3.6 Material de campo

- Turba
- Fundas de siembra
- Plástico de invernadero
- Tijeras de podar
- Papel absorbente

- Guantes
- Pomina

2.4 Metodología

Las cuatro etapas del experimento fueron:

- Fase I: Introducción *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).
- Fase II: Multiplicación *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) bajo los sistemas convencional e inmersión temporal.
- Fase III: Enraizamiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) de explantes provenientes del sistema convencional.
- Fase IV: Adaptación a condiciones de invernadero para plántulas obtenidas del sistema convencional.

2.4.1 Fase I: Introducción *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).

2.4.1.1 Factores en estudio

- a) Especies de *Paulownia* (e)

Se utilizaron dos especies y un híbrido:

e1= *Paulownia elongata*

e2= *Paulownia fortunei*

e3= *Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*
- b) Métodos de desinfección de los explantes (p)

Se utilizaron tres protocolos de desinfección:

- p1= Alcohol 70% + hipoclorito de sodio 1% + agua destilada. Modificado de Castillo, Gutiérrez, Buenrostro, & Cetina (2012, págs. 41-49).
- p2= Alcohol 70% + hipoclorito de sodio 4% + agua destilada. Modificado de Ipekci, Atinkut, Kazan, Bajrovic, & Gozukirmizi (2001, págs. 113-115).
- p3=Agua + fungicidas/bactericidas + PVP + Hipoclorito de sodio al 1% + Ácido ascórbico + Tween 20. Modificado de Aguilar, Vilalobos, & Salgado (2001, págs. 2-5).

c) Medios de cultivo para la introducción (m)

Se utilizaron dos medios de cultivo descritos en la tabla 5:

Tabla 5:

Medios de cultivo utilizados en la etapa I: Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP), 2014

Medio de cultivo	Composición
m1	MS completo suplementado (Anexo 2) con: 7 g/L agar, 30 g/L azúcar comercial con pH=5,8 (Castillo et al. 2012)
m2	MS completo suplementado (Anexo 2) con: 7 g/L agar, 30 g/L azúcar comercial, 0,1 mg/L ANA, 1 mg/L BAP con pH= 5,8 (Ipekci & Gozukirmizi, 2003)

Nota: A. Cárdenas, 2014

2.4.1.2 Tratamientos

Se aplicaron 18 tratamientos que resultaron de la interacción de los tres factores en estudio: Tres protocolos de desinfección, dos medios de cultivo, dos especies (*Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei*) y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*), la combinación se presenta en la tabla 6.

Tabla 6:

Tratamientos de desinfección e introducción para *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei x Paulownia elongata*).

t	Codificación	Descripción
t ₁	e ₁ p ₁ m ₁	<i>Paulownia elongata</i> sometida a desinfección con Alcohol 70%+ hipoclorito de sodio 1%+ agua destilada. Cultivada en: MS1X
t ₂	e ₁ p ₁ m ₂	<i>Paulownia elongata</i> sometida a desinfección con Alcohol 70%+ hipoclorito de sodio 1%+ agua destilada. Cultivada en: MS+ 1 mg/L BAP+ 0,1 mg/L ANA.
t ₃	e ₁ p ₂ m ₁	<i>Paulownia elongata</i> sometida a desinfección con Alcohol 70%+hipoclorito de sodio 4% + agua destilada. Cultivada en: MS1X
t ₄	e ₁ p ₂ m ₂	<i>Paulownia elongata</i> sometida a desinfección con Alcohol 70%+hipoclorito de sodio 4% + agua destilada. Cultivada en: MS + 1 mg/L BAP+ 0,1 mg/L ANA.
t ₅	e ₁ p ₃ m ₁	<i>Paulownia elongata</i> sometida a desinfección con Agua+ fungicidas/bactericidas+ PVP+ Hipoclorito de sodio al 1% + Ácido ascórbico+ Tween 20. Cultivada en: MS1X
t ₆	e ₁ p ₃ m ₂	<i>Paulownia elongata</i> sometida a desinfección con Agua+ fungicidas/bactericidas + PVP+ Hipoclorito de sodio al 1% + Ácido ascórbico+ Tween 20. Cultivada en: MS+ 1 mg/L BAP+ 0,1 mg/L ANA
t ₇	e ₂ p ₁ m ₁	<i>Paulownia fortunei</i> sometida a desinfección con Alcohol 70%+ hipoclorito de sodio 1%+ agua destilada. Cultivada en: MS1X
t ₈	e ₂ p ₁ m ₂	<i>Paulownia fortunei</i> sometida a desinfección con Alcohol 70%+ hipoclorito de sodio 1%+ agua destilada. Cultivada en: MS +1 mg/L BAP+ 0,1 mg/L ANA.
t ₉	e ₂ p ₂ m ₁	<i>Paulownia fortunei</i> sometida a desinfección con Alcohol 70%+hipoclorito de sodio 4% + agua destilada. Cultivada en: MS1X
t ₁₀	e ₂ p ₂ m ₂	<i>Paulownia fortunei</i> sometida a desinfección con Alcohol 70%+hipoclorito de sodio 4% + agua destilada. Cultivada en: MS+ 1 mg/L BAP+ 0,1 mg/L ANA.
t ₁₁	e ₂ p ₃ m ₁	<i>Paulownia fortunei</i> sometida a desinfección con Agua+ fungicidas/bactericidas + PVP+ Hipoclorito de sodio al 1% + Ácido ascórbico+ Tween 20. Cultivada en: MS1 X
t ₁₂	e ₂ p ₃ m ₂	<i>Paulownia fortunei</i> sometida a desinfección con Agua+ fungicidas/bactericidas + PVP+ Hipoclorito de sodio al 1% + Ácido ascórbico+ Tween 20. Cultivada en: MS+ 1 mg/L BAP+ 0,1 mg/L ANA
t ₁₃	e ₃ p ₁ m ₁	<i>Paulownia fortunei x Paulownia elongata</i> sometida a desinfección con Alcohol 70%+ hipoclorito de sodio 1%+ agua destilada. Cultivada en: MS1X
t ₁₄	e ₃ p ₁ m ₂	<i>Paulownia fortunei x Paulownia elongata</i> sometida a desinfección con Alcohol 70%+ hipoclorito de sodio 1%+ agua destilada. Cultivada en: MS+ 1 mg/L BAP+ 0,1 mg/L ANA.
t ₁₅	e ₃ p ₂ m ₁	<i>Paulownia fortunei x Paulownia elongata</i> sometida a desinfección con Alcohol 70% +hipoclorito de sodio 4% + agua destilada. Cultivada en: MS1X
t ₁₆	e ₃ p ₂ m ₂	<i>Paulownia fortunei x Paulownia elongata</i> sometida a desinfección con Alcohol 70% +hipoclorito de sodio 4% + agua destilada. Cultivada en: MS + 1 mg/L BAP+ 0,1 mg/L ANA.
t ₁₇	e ₃ p ₃ m ₁	<i>Paulownia fortunei x Paulownia elongata</i> sometida a desinfección con Agua+ fungicidas/bactericidas + PVP+ Hipoclorito de sodio al 1% + Ácido ascórbico+ Tween 20. Cultivada en: MS1X
t ₁₈	e ₃ p ₃ m ₂	<i>Paulownia fortunei x Paulownia elongata</i> sometida a desinfección con Agua+ fungicidas/bactericidas + PVP+ Hipoclorito de sodio al 1% + Ácido ascórbico+ Tween 20. Cultivada en: MS+ 1 mg/L BAP+ 0,1 mg/L ANA.

Nota: A. Cárdenas, 2014

2.4.1.3 Unidad Experimental

La unidad experimental se conformó por un tubo de ensayo de 18 mm x 150 mm, con 5 mL de medio de cultivo semisólido, con una yema de *Paulownia*.

2.4.1.4 Análisis estadístico

2.4.1.4.1 Diseño experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) que se dispuso en un arreglo factorial 3x3x2 (3 especies de *Paulownia* por 3 tratamientos de desinfección por 2 medios para introducción), con 10 observaciones.

2.4.1.4.2 Esquema del análisis de la varianza

El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) de una vía para el establecimiento de un protocolo de desinfección e introducción se presenta en la tabla 7.

Tabla 7

ADEVA para el establecimiento de un protocolo de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*). INIAP, Cutuglagua-Pichincha, 2014

Fuente de Variación (F de V)	Grados de libertad (GL)
Total	179
Tratamientos	17
Protocolo de desinfección (P)	2
Medio de introducción (M)	1
P x M	2
Especie (E)	2
P x E	4
M x E	2
P x M x E	4
Error Experimental	162

Nota: A. Cárdenas, 2014

2.4.1.4.3 Análisis funcional

Se realizó la prueba de significancia Tukey al 5%, para los factores en estudio y sus interacciones que presentaron diferencias estadísticas significativas, empleando el programa de software INFOSTAT.

2.4.1.5 Variables y métodos de evaluación

2.4.1.5.1 Porcentaje de contaminación (%)

Por observación visual, se registró la presencia o ausencia de micelio de hongos o de colonias bacterianas en los explantes y en el medio de cultivo a los 15 días. Se calificó con 0 la ausencia total de contaminación y con 1 la presencia de vitropatógenos.

2.4.1.5.2 Longitud de brote (cm)

Esta variable se evaluó con observaciones a los 20 y 30 días y se determinó el crecimiento de los brotes con la ayuda de una regla se midió desde la base del brote hasta el ápice de la hoja más alta. Las mediciones se promediaron y se expresaron en cm/brote.

Para esta variable las medias fueron transformadas con \log_{10} en el programa estadístico INFOSTAT para que estos mantengan su normalidad debido al uso de 0 en la ausencia de explantes en los tubos de ensayo. Se aplicó esta transformación debido a que el modelo lineal ($Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + e_{ij}$) indica que el efecto del tratamiento y el error experimental, son todos ellos aditivos, por eso transformará en aditiva la relación multiplicativa y en consecuencia el modelo lineal podrá ser aplicado a los nuevos datos (Molina, 2014, págs. 1-2).

2.4.1.5.3 Porcentaje de brotación (%)

Por observación visual, se registró la brotación de las yemas a los 10, 20 y 30 días a partir de la siembra, se estimó una relación porcentual de las mismas frente al número total de yemas/tubo.

2.4.1.5.4 Porcentaje de oxidación (%)

Por observación visual, se registró la oxidación en los explantes a los 15 días. Se calificó con 0 la ausencia y con 1 la presencia. Evaluados sobre el total de explantes introducidos por 100.

2.4.1.6 Manejo específico del Experimento

a) Recolección del material vegetal

Después del control fitosanitario realizado en el invernadero se procedió a cortar 180 yemas axilares y apicales de 1,5-3 cm de largo de ramas jóvenes, con una tijera desinfectada con alcohol al 70%.

Se colocaron los explantes en frascos con agua destilada estéril hasta transportarlos al Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

b) Desinfección del explante

Se realizó una pre-desinfección para los tres protocolos de desinfección, detallada a continuación:

En el laboratorio se eliminaron las hojas de 200 brotes, luego fueron sumergidos en una solución de agua con detergente y cepillados, para eliminar posibles contaminantes como polvo y corteza. Posteriormente, fueron sumergidos en una solución de povidyn jabón, tween 20 y agua destilada en agitación por 10 minutos, luego el material fue colocado en un frasco con una solución de povidyn 1% y agua destilada con agitación durante 10 minutos a 70 RPM, pasado ese tiempo se realizó un lavado con agua destilada estéril en agitación constante durante 10 minutos a 70 RPM (LCT Laboratorio de cultivo de tejidos, Departamento de Nacional de Biotecnología, INIAP, 2014).

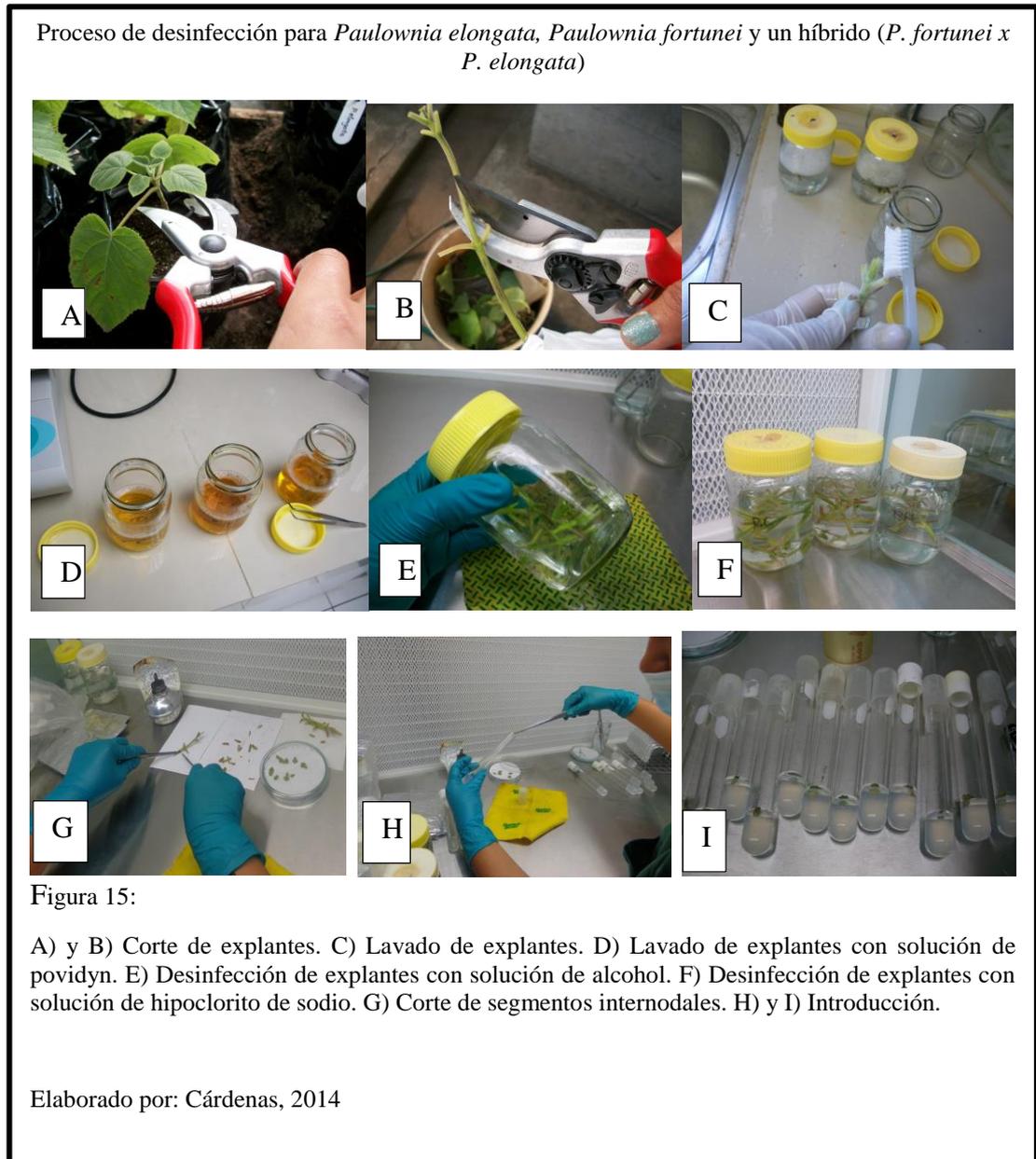
Para la desinfección se utilizaron los métodos modificados de Castillo et al. (2012, págs. 41-49), Ipekci et al. (2001, págs. 113-115) y Aguilar et al. (2001, pág. 34). Estos se detallan a continuación:

Protocolo 1: Modificado de Castillo y otros (2012, págs. 41-49)

En la cámara de flujo laminar, fueron colocados en alcohol al 70% (v/v) durante 30 segundos con agitación, los explantes se transvasaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1%(v/v) durante 10 minutos y se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril. En la figura 15 se esquematiza el proceso de desinfección.

Protocolo 2: Modificado de Ipekci y otros (2001, págs. 113-115)

En la cámara de flujo laminar, se colocaron 60 explantes en frascos con alcohol al 70% (v/v) con agitación durante 1 minuto, luego se transvasaron en una solución de hipoclorito de sodio al 4%(v/v) durante 2 minutos y se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril. En la figura 15 se esquematiza el proceso de desinfección.



Protocolo 3: Modificado de Aguilar y otros (2001, pág. 34)

Una vez que los explantes no contenían ningún residuo se colocaron en una solución de povidyn 1% y agua destilada con agitación durante 10 minutos a 70 RPM, luego

el material fue colocado en una solución de Benomyl (benzimidazol) 1 g/L, Phyton (sulfato de cobre pentahidratado) 1%, PVP (Polivinilpirrolidona) 3 g/L y Rifampicina 0,5 mL/L durante 1 hora con agitación y, finalmente se realizó un enjuague con agua destilada estéril. En la cámara de flujo laminar, se colocaron los explantes en una solución de hipoclorito de sodio al 1%(v/v) con 100 mg/L de ácido ascórbico y 2 gotas de tween 20 durante 10 minutos y se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril.

c) Siembra de explantes

Las yemas ya desinfectadas, se secaron con la ayuda de una servilleta estéril, se cortaron a un tamaño de 1 cm aproximadamente, se eliminaron las partes necrosadas por la desinfección y se sembraron en tubos de ensayo que contenían el medio descrito en la Tabla 6. Los explantes fueron incubados por 4 semanas, bajo condiciones controladas de temperatura de 27 ± 1 °C y un fotoperiodo de 16 horas/luz.

2.4.2 Fase II: Multiplicación *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) bajo el sistema convencional e inmersión temporal

2.4.2.1 Sistema convencional

Una vez obtenidas las plántulas libres de contaminantes estas se pasaron a un medio de cultivo semisólido, constituido por micronutrientes, macronutrientes, fuentes de hierro, vitaminas, hormonas y agentes gelificantes.

2.4.2.1.1 Factores en estudio

a) Especies de *Paulownia* (e)

Se utilizaron dos especies y un híbrido:

e1= *Paulownia elongata*

e2= *Paulownia fortunei*

e3= *Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*

b) Medios de multiplicación (m)

m1= MS + 4 mg/L BAP + 0,2 mg/L ANA. Propuesto por (Castillo, Gutiérrez, Buenrostro, & Cetina, 2012, págs. 41-49).

m2= MS + 2 mg/L BAP + 0,05 mg/L ANA. Propuesto por Zayova (2011, págs. 422-425).

m3= MS + 0,2 mg/L BAP. Propuesto por Corredoira, Cernadas, & San (2010, págs. 5-22).

m4= MS + 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L ANA. Propuesto por Castellanos, Rodríguez, Rodríguez, & Rodríguez (2006, págs. 1-12).

La preparación de los medios se describe en la tabla 8.

Tabla 8:

Medios de cultivo utilizados en la etapa II: Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP), 2014

Medio de cultivo	Composición
m1	MS completo (Anexo 2) suplementado con: 7 g/L agar, 30 g/L azúcar comercial, 4 mg/L BAP, 0,2 mg/L ANA con pH= 5,8 (Castillo et al. 2012).
m2	MS completo (Anexo 2) suplementado con: 7 g/L agar; 30 g/l azúcar comercial; 2 mg/L BAP; 0,05 mg/L ANA con pH= 5,8 (Zayova, 2011) .
m3	MS completo (Anexo 2) suplementado con: 6 g/L agar; 30 g/L azúcar comercial; 0,2 mg/L BAP con pH= 5,8 (Corredoira, Cernadas, & San, 2010).
m4	MS completo (Anexo 2) suplementado con: 8 g/L agar; 30 g/L azúcar comercial; 1 mg/L BAP; 0,1 mg/L ANA con pH= 5,8 (Castellanos, Rodríguez, Rodríguez, & Rodríguez, 2006).

Nota: A. Cárdenas, 2014

2.4.2.1.2 Tratamientos

El número de tratamientos que se aplicaron fueron 12 y resultaron de la interacción de los dos factores en estudio: Cuatro medios de cultivo, dos especies (*Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei*) y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*), la combinación se presenta en la tabla 9.

Tabla 9:

Tratamientos para la multiplicación *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*), Cutuglagua-Pichincha, 2014

t	CODIFICACIÓN	DETALLE
t ₁	e ₁ m ₁	<i>Paulownia elongata</i> cultivada en: MS + 4 mg/L BAP + 0,2 mg/L ANA.
t ₂	e ₁ m ₂	<i>Paulownia elongata</i> cultivada en: MS +2 mg/L BAP + 0,05 mg/L ANA.
t ₃	e ₁ m ₃	<i>Paulownia elongata</i> cultivada en: MS + 0,2 mg/L BAP.
t ₄	e ₁ m ₄	<i>Paulownia elongata</i> cultivada en: MS+ 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L ANA.
t ₅	e ₂ m ₁	<i>Paulownia fortunei</i> cultivada en: MS+4 mg/L BAP + 0,2 mg/L ANA.
t ₆	e ₂ m ₂	<i>Paulownia fortunei</i> cultivada en: MS + 2 mg/L BAP + 0,05 mg/L ANA.
t ₇	e ₂ m ₃	<i>Paulownia fortunei</i> cultivada en: MS + 0,2 mg/L BAP.
t ₈	e ₂ m ₄	<i>Paulownia fortunei</i> cultivada en: MS+ 1 mg/L BAP. + 0,1 mg/L ANA.
t ₉	e ₃ m ₁	<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i> cultivada en: MS + 4 mg/L BAP + 0,2 mg/L ANA.
t ₁₀	e ₃ m ₂	<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i> cultivada en: MS+ 2 mg/L BAP + 0,05 mg/L ANA.
t ₁₁	e ₃ m ₃	<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i> cultivada en: MS+ 0,2 mg/L BAP.
t ₁₂	e ₃ m ₄	<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i> cultivada en: MS+ 1 mg/L BAP. + 0,1 mg/L ANA.

Nota: A. Cárdenas, 2014

2.4.2.1.3 Unidad experimental

La unidad experimental estuvo conformada por un frasco de vidrio de 5,6 cm x 9 cm, con 30 mL de medio de cultivo semisólido, con dos yemas de *Paulownia*, libres de agentes contaminantes, provenientes de la etapa de introducción.

2.4.2.1.4 Análisis estadístico

a) Diseño experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) dispuesto en arreglo factorial 3x4 (3 especies de *Paulownia* por 4 medios para la multiplicación), con 10 observaciones.

b) Esquema del análisis de la varianza

El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) para el establecimiento de un protocolo de desinfección e introducción se presenta en la tabla 10.

Tabla 10

ADEVA para el establecimiento de un Medio de multiplicación para *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*). INIAP, Cutuglagua-Pichincha, 2014.

Fuente de Variación (F de V)	Grados de libertad (GL)
Total	119
Tratamientos	11
Especies (E)	2
Medios de multiplicación (M)	3
E x M	6
Error Experimental	108

Nota: A. Cárdenas, 2014

c) Análisis funcional

Se realizó la prueba de significancia Tukey al 5%, para los factores en estudio y sus interacciones que presentaron diferencias estadísticas significativas, empleando el programa de software INFOSTAT.

Modelo matemático usado:

$$Y_{ij} = \mu + E + M + E * M + e$$

Dónde:

μ = Media general

E= Especie

M= Medio de cultivo

E*M= Interacción entre especie y medio de cultivo

e= Error experimental

2.4.2.1.5 Variables y métodos de evaluación

a) Altura de los brotes (cm)

La evaluación se realizó a los 10, 20 y 30 días a partir de la siembra, con la ayuda de una regla milimetrada de 30 cm y hojas milimetradas estériles, desde la base del tallo hasta la yema terminal (punta), se registraron los datos en cm.

b) Número de nudos

Se contabilizó el número de nudos que presentó cada uno de los explantes a los 10, 20 y 30 días después de la siembra, por medio del conteo por observación y luego se dividió el total de nudos para el número de explantes que se sembró para sacar un promedio del número de nudos por frasco.

c) Índice de multiplicación

El índice de multiplicación se evaluó a los 30 días, posteriores a la siembra, se contabilizó el número de nudos obtenidos dividido para el número de plantas, para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$IM = \frac{\text{Número de nudos a los 30 días}}{\text{Número de plantas evaluadas}}$$

d) Tasa de pérdida

Se contabilizó el número de explantes contaminados y el número de explantes muertos a partir de la siembra hasta los 30 días para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$TP = \frac{\# \text{ de explantes perdidos}}{\# \text{ de explantes introducidos}} \times 100$$

2.4.2.1.6 Manejo específico del Experimento

a) Medios de cultivo

Para la fase de multiplicación de *Paulownia* se evaluaron cuatro medios de cultivo, descritos en la Tabla 8.

b) Subcultivo de explantes

En la cámara de flujo laminar, se eliminaron las hojas y raíces presentes hasta obtener un brote de 2-3 cm de longitud aproximadamente. Los explantes se sembraron en frascos de vidrio con medio de cultivo para multiplicación, se incubaron durante 4 semanas, bajo condiciones controladas de temperatura a 27 ± 1 °C y un fotoperiodo de 16 horas luz. En la figura 16 se ilustra el proceso.

Multiplicación *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei*, y un híbrido (*P. fortunei* x *P. elongata*) bajo el sistema convencional.

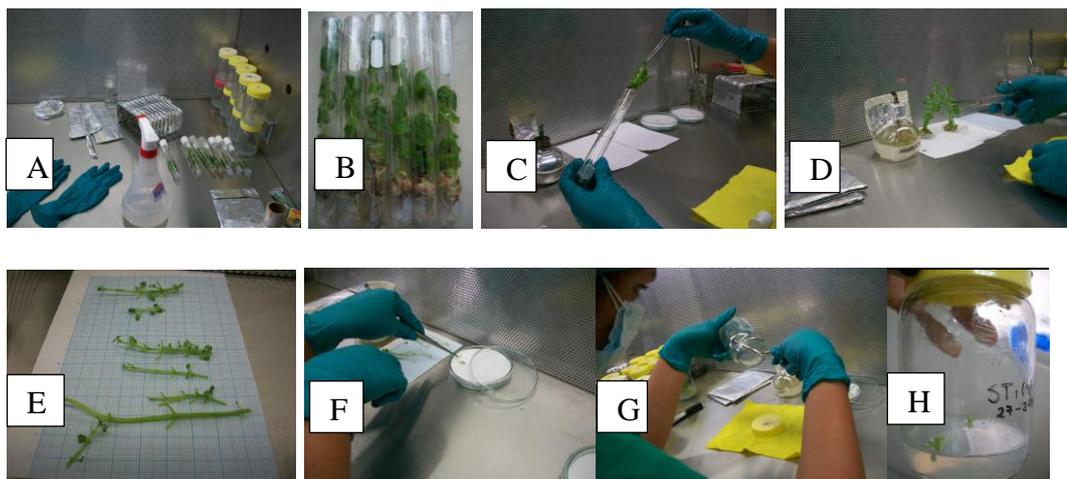


Figura 16

A) Preparación de materiales para la multiplicación. B) Plántulas de la fase de introducción. C) Retiro de los brotes de los tubos de ensayo. D) y E) Corte de raíces y hojas del explante. F) Corte de yemas. G) y H) Siembra de explantes en medio de cultivo.

Elaborado por: Cárdenas, 2014

2.4.2.2 Sistemas de Inmersión temporal

Una vez desarrollado el protocolo de multiplicación de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) en el sistema convencional de propagación masiva, se procedió a probar bajo el Sistema de Inmersión Temporal, utilizando el medio de cultivo que dio los resultados óptimos.

2.4.2.2.1 Factores en estudio

- a) Especies de *Paulownia* (e)

e1= *Paulownia elongata*

e2= *Paulownia fortunei*

e3= *Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*.

- b) Frecuencia (f)

f1= Cada 3 horas por un minuto (Perrugoría, 2012).

f2= Cada 6 horas por un minuto (LCT Laboratorio de cultivo de tejidos, Departamento de Nacional de Biotecnología, INIAP, 2014).

2.4.2.2.2 Tratamientos

El número de tratamientos que se aplicaron fueron 6 y resultaron de la interacción de los dos factores en estudio: Dos frecuencias, dos especies (*Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei*) y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*), la combinación se presenta en la tabla 11.

Tabla 11:

Tratamientos para la etapa de multiplicación bajo sistemas de Inmersión Temporal de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*). INIAP, Cutuglagua-Pichincha, 2014

t	CODIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
t ₁	e ₁ f ₁	<i>Paulownia elongata</i> cada 3 horas por un minuto
t ₂	e ₁ f ₂	<i>Paulownia elongata</i> cada 6 horas por un minuto
t ₃	e ₂ f ₁	<i>Paulownia fortunei</i> cada 3 horas por un minuto
t ₄	e ₂ f ₂	<i>Paulownia fortunei</i> cada 6 horas por un minuto
t ₅	e ₃ f ₁	<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i> cada 3 horas por un minuto
t ₆	e ₃ f ₂	<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i> cada 6 horas por un minuto

Nota: A. Cárdenas, 2014

2.4.2.2.3 Unidad Experimental

Estuvo conformada por dos frascos de vidrio de 3 L de capacidad, uno de los cuales contenía 250 mL de medio de cultivo líquido y el otro frasco contenía 20 explantes con 4 nudos cada uno, provenientes de la etapa de multiplicación convencional.

2.4.2.2.4 Análisis estadístico

a) Diseño experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) dispuesto en arreglo factorial 3x2 (3 especies de *Paulownia* por 2 frecuencias) con 3 observaciones.

b) Esquema del análisis de la varianza

El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) para la multiplicación bajo sistemas de inmersión temporal se presenta en el tabla 12.

Tabla 12:

ADEVA para la multiplicación bajo sistemas de inmersión temporal de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*). INIAP, Cutuglagua – Pichincha 2014.

Fuente de Variación (F de V)	Grados de libertad (GL)
Total	17
Tratamientos	5
Especies (E)	2
Frecuencia (f)	1
E x f	2
Error Experimental	12

Nota: A. Cárdenas, 2014

c) Análisis funcional

Se realizó la prueba de significancia Tukey al 5% y Diferencia Mínima Significativa (DMS) al 5% para los factores en estudio y sus interacciones que presentaron diferencias estadísticas significativas, empleando el programa de software INFOSTAT.

Modelo matemático usado:

$$Y_{ij} = \mu + E + M + E * M + e$$

Dónde:

μ = Media general

E = Especie

M = Medio de cultivo

$E * M$ = Interacción entre especie y medio de cultivo

e = Error experimental

2.4.2.2.5 Variables y Métodos de evaluación

a) Brotación de explantes (%)

Por observación visual, se registró la brotación de las yemas a los 15 y 30 días a partir de la siembra, se estimó una relación porcentual de las mismas frente al número total de yemas/plántula y por unidad experimental.

b) Longitud de brote (cm)

Se determinó la longitud en cm de los brotes, con la ayuda de una regla milimetrada desde la base del tallo hasta el ápice del brote y se obtuvo un promedio por cada tratamiento a los 30 días después de la siembra.

c) Porcentaje de brotes hiperhidratados (%)

La presencia de explantes con síntomas de hiperhidricidad se determinó de forma visual, por sensibilidad al quiebre, se estableció mediante relación porcentual entre el número brotes con hiperhidratación y el número total de brotes. Se evaluó a los 30 días.

$$\text{Porcentaje de hiperhidratación} = \frac{\text{Número de brotes hiperhidratados}}{\text{Número de total de brotes}} \times 100$$

d) Índice de multiplicación

Se registró el número de explantes que produce una planta a los 30 días después de la siembra.

$$IM = \frac{\text{Número de nudos a los 30 días}}{\text{Número de plantas evaluadas}}$$

2.4.2.2.6 Manejo específico del experimento

a) Preparación de materiales para SIT

Se empleó el Sistema de Inmersión Temporal propuesto por Perrugoría (2012, págs. 1-2), con algunas modificaciones. Se utilizaron frascos de vidrio transparentes de 3L de capacidad, los cuales estuvieron interconectados por parejas mediante mangueras de silicona. En uno de los frascos se colocó el medio de cultivo líquido de multiplicación. Cada uno de los frascos se interconectó a un sistema de entrada de aire proveniente de un compresor, el cual se accionó por un programador automático (PLC) para el control de la frecuencia, la duración de las inmersiones y la luminosidad. El aire entrante o saliente se esterilizó por medio de filtros hidrófobos de 0,2 μm , para el control de la contaminación. Todo el material fue previamente esterilizado en una autoclave a 121 °C por 20 minutos. En la figura 17 se esquematiza el proceso.

b) Preparación del medio de cultivo para los SIT

Los explantes se multiplicaron en el medio líquido Murashige y Skoog (1962) con vitaminas, suplementado con 0,2 mg/L de BAP y el 30 % de azúcar. El pH se ajustó a 5,8 antes de la esterilización a 121 °C por 20 minutos.

c) Siembra de explantes en los SIT

En la cámara de flujo se segmentaron los brotes provenientes de la fase de multiplicación convencional en explantes con 4 nudos, se tomaron 20 y fueron sembrados en uno de los frascos. En las yemas empleadas se eliminó la dominancia apical. Los cultivos se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 16 horas luz, a una temperatura de 27 ± 2 °C. El sistema se mantuvo durante 30 días.

Multiplicación *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei*, y un híbrido (*P. fortunei* x *P. elongata*) bajo el Sistema de Inmersión Temporal.

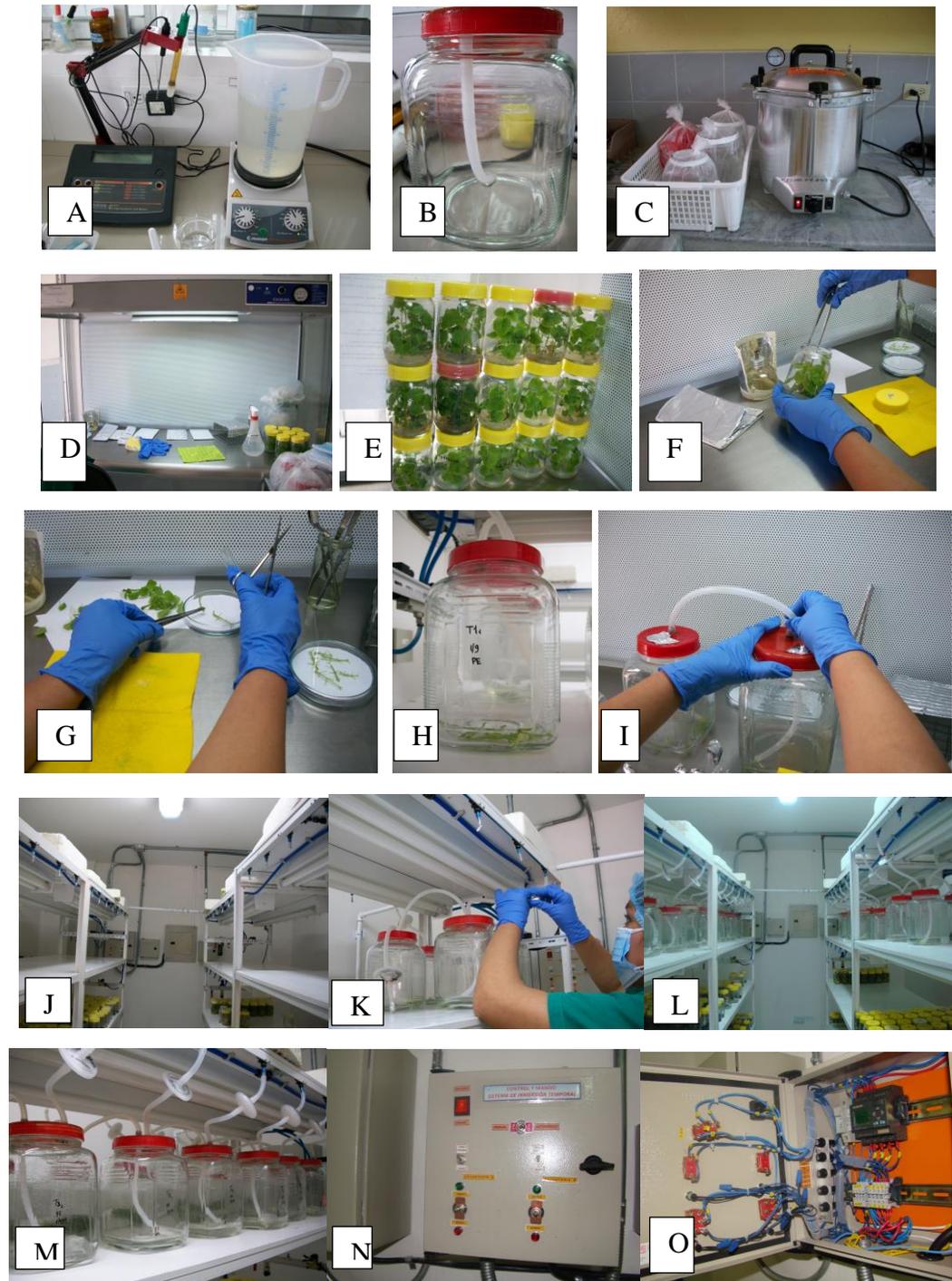


Figura 17:

A) Preparación de medios. B) Llenado de medios de cultivo líquidos. C) Autoclavado de medios y de frascos para SIT. D) Preparación de instrumentos en la cámara de flujo laminar. E) Plántulas de *Paulownia* multiplicadas bajo el sistema convencional. F) Retiro de las plántulas de los frascos. G) Corte de raíces y hojas del explante. H) Siembra de explantes en frascos con medio de cultivo líquido. I) Ensamblaje de mangueras entre frascos de vidrio BIT. J) Cuarto del sistema Temporal (SIT). K) Instalación de frascos en el sistema. L) y M) Frascos instalados en el cuarto del sistema temporal. N) y O) Control y mando.

Elaborador por: Cárdenas, 2014

2.4.3 Fase III: Enraizamiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*), en medio sólido de explantes provenientes del sistema convencional.

2.4.3.1 Factores en estudio

a) Especies de *Paulownia* (e)

Se utilizaron dos especies y un híbrido:

e1= *Paulownia elongata*

e2= *Paulownia fortunei*

e3= *Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*

b) Medio de enraizamiento (m)

m1= MS + 0,2 mg/L ANA + 0,4 mg/L IBA. Propuesto por (Bergmann & Moon, 1997, pág. 315)

m2= MS + 0,4 mg/L IBA. Propuesto por Castillo et al. (2012)

m3= MS + 1,5 mg/L IBA. Propuesto por Castellanos et al. (2006)

Los componentes de los medios se detallan en la tabla 13.

Tabla 13:

Medios de cultivo utilizados en la etapa III: Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP), 2014

Medio de cultivo	Composición
m1	MS completo (Anexo 2) suplementado con: 7 g/L agar, 20 g/L azúcar comercial; 0,2 mg/L ANA; 0,4 mg/L IBA con pH= 5,8 (Bergmann & Moon, 1997, pág. 315).
m2	MS completo (Anexo 2) suplementado con: 7 g/L agar, 30 g/L azúcar comercia; 0,4 mg/L IBA, con pH= 5,8 (Castillo, Gutiérrez, Buenrostro, & Cetina, 2012, págs. 41-49).
m3	MS completo (Anexo 2) suplementado con: 7 g/L agar, 20 g/L azúcar comercial; 1,5 mg/L IBA con pH= 5,8 (Castellanos, Rodríguez, Rodríguez, & Rodríguez, 2006, págs. 1-12).

Nota: A. Cárdenas, 2014

2.4.3.2 Tratamientos

El número de tratamientos que se aplicaron fueron 9 y resultaron de la interacción de los dos factores en estudio: Tres medios de cultivo, dos especies (*Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei*) y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*), la combinación se presenta en la tabla 14.

Tabla 14:

Tratamientos para el enraizamiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*). INIAP, Cutuglagua-Pichincha, 2014.

t	CODIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
t ₁	e ₁ m ₁	<i>Paulownia elongata</i> cultivada en: MS + 0,2 mg/L ANA+ 0,4 mg/L IBA.
t ₂	e ₁ m ₂	<i>Paulownia elongata</i> cultivada en: MS + 0,4 mg/L IBA
t ₃	e ₁ m ₃	<i>Paulownia elongata</i> cultivada en: MS + 1,5 mg/L IBA.
t ₄	e ₂ m ₁	<i>Paulownia fortunei</i> cultivada en: MS + 0,2 mg/L ANA+ 0,4 mg/L IBA.
t ₅	e ₂ m ₂	<i>Paulownia fortunei</i> cultivada en: MS + 0,4 mg/L IBA
t ₆	e ₂ m ₃	<i>Paulownia fortunei</i> cultivada en: MS + 1,5 mg/L IBA
t ₇	e ₃ m ₁	<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i> cultivada en: MS + 0,2 mg/L ANA+ 0,4 mg/L IBA
t ₈	e ₃ m ₂	<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i> cultivada en: MS + 0,4 mg/L IBA.
t ₉	e ₃ m ₃	<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i> cultivada en: MS + 1,5 mg/L IBA

Nota: A. Cárdenas, 2014

2.4.3.3 Unidad Experimental

La unidad experimental estuvo conformada por un frasco de vidrio de 5,6 cm x 9 cm, con 30 mL de medio de cultivo semisólido, con dos yemas de *Paulownia*, libres de agentes contaminantes, provenientes de la etapa de multiplicación bajo el sistema convencional.

2.4.3.4 Análisis estadístico

2.4.3.4.1 Diseño experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) dispuesto en arreglo factorial 3x3 (3 especies de *Paulownia* por 3 medios de enraizamiento), con 10 observaciones.

2.4.3.4.2 Esquema del análisis de la varianza

El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) para el establecimiento de un medio enraizante se presenta en la tabla 15.

Tabla 15:

ADEVA para el establecimiento de un Medio de enraizamiento para *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*). INIAP, Cutuglagua-Pichincha, 2014.

Fuente de Variación (F de V)	Grados de libertad (GL)
Total	89
Tratamientos	8
Especies de <i>Paulownia</i> (E)	2
Medio Enraizante (M)	2
E x M	4
Error Experimental	81

Nota: A. Cárdenas, 2014

2.4.3.4.3 Análisis funcional

Se realizó la prueba de significancia Tukey al 5% y Diferencia Mínima Significativa (DMS) al 5% para los factores en estudio y sus interacciones que presentaron diferencias estadísticas significativas, empleando el programa de software INFOSTAT.

Modelo matemático usado:

$$Y_{ij} = \mu + E + M + E * M + e$$

Dónde:

μ = Media general

E = Especie

M = Medio de cultivo

$E * M$ = Interacción entre especie y medio de cultivo

e = Error experimental

2.4.3.5 Variables y métodos de evaluación

2.4.3.5.1 Número de raíces

Se contabilizaron las raíces de cada vitroplanta, a los 15 y 30 días de haber sido sembradas.

2.4.3.5.2 Longitud de las raíces (cm)

Se determinó la longitud de la raíz principal a los 15 y 30 días luego de haber sido sembrados los brotes en el medio enraizante. Se utilizó una regla milimetrada, se midió desde la base del tallo hasta la terminación de la raíz, y la medida se expresó en centímetros (cm).

2.4.3.5.3 Longitud de la plántula (cm)

Con la ayuda de una regla milimetrada se midió la longitud de la plántula, desde la base del tallo hasta el ápice a los 15 y 30 días a partir de la siembra.

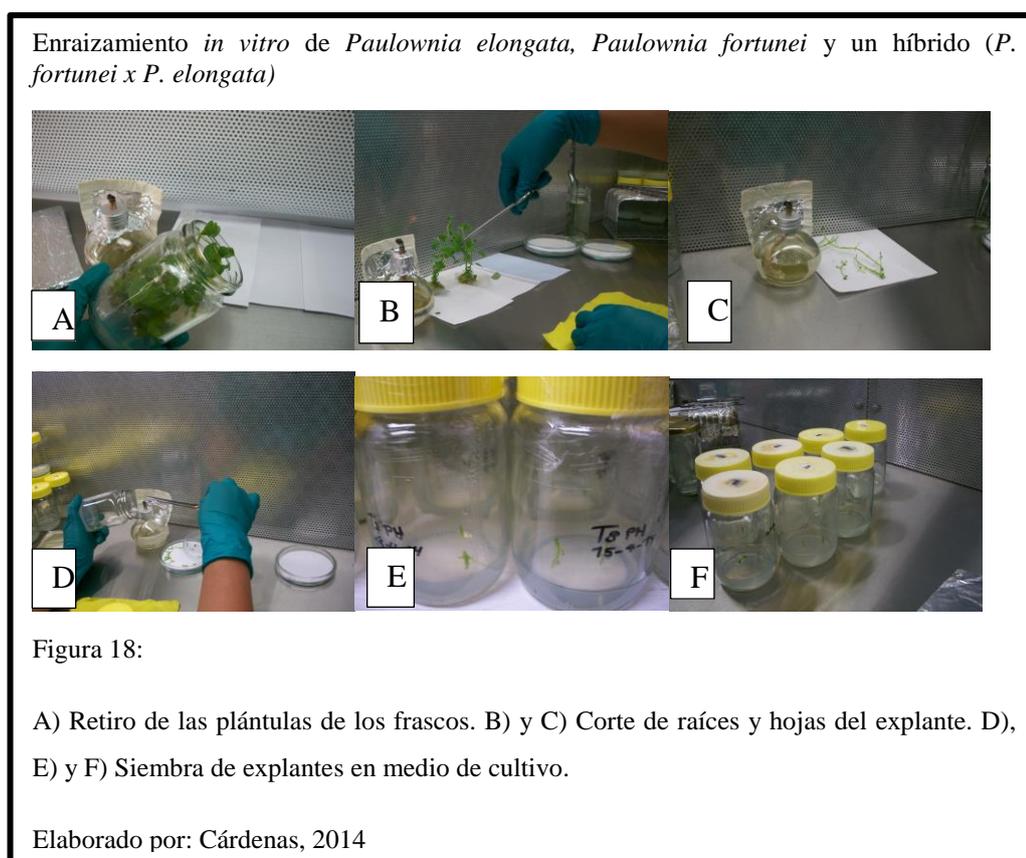
2.4.3.6 Manejo específico del Experimento

a) Medios de cultivo

Para la fase de enraizamiento de *Paulownia* se evaluaron tres medios de cultivo, los mismos que están descritos en la tabla 13.

b) Siembra de explantes

Se utilizaron brotes procedentes de la fase II (multiplicación bajo el sistema convencional), que mostraron mayor vigor. En la cámara de flujo laminar, se cortaron las hojas y raíces presentes hasta obtener un brote de 2-3 cm de longitud aproximadamente con dos nudos. Se incubaron durante 4 semanas, bajo condiciones controladas de temperatura a 27 ± 1 °C y un fotoperíodo de 16 horas luz/oscuridad. En la figura 18 se esquematiza el proceso.



2.4.4 Fase IV: Adaptación a condiciones de invernadero para plántulas obtenidas del sistema de micropropagación convencional.

2.4.4.1 Factores en estudio

a) Especies de *Paulownia* (e)

Se utilizaron dos especies y un híbrido:

e1= *Paulownia elongata*

e2= *Paulownia fortunei*

e3= *Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*

b) Sustratos (s)

s1= Turba BM2 80% + perlita 10% + vermiculita 10%

s2= Pomina 50% + tierra negra 50%

2.4.4.2 Tratamientos

El número de tratamientos que se aplicaron fueron 6 y resultaron de la interacción de los dos factores en estudio: Dos tipos de sustratos, dos especies (*Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei*) y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*), la combinación se presenta en la tabla 16.

Tabla 16:

Tratamientos para la adaptación a condiciones de invernadero de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*). INIAP, Cutuglagua-Pichincha, 2014.

t	CODIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
t ₁	e ₁ s ₁	<i>Paulownia elongata</i> cultivada en: Turba BM2 80% + perlita 10 % + vermiculita 10%.
t ₂	e ₂ s ₁	<i>Paulownia elongata</i> cultivada en: Pomina 50% + tierra negra 50%.
t ₃	e ₃ s ₁	<i>Paulownia fortunei</i> cultivada en: Turba BM2 80% + perlita 10 % + vermiculita 10%.
t ₄	e ₁ s ₂	<i>Paulownia fortunei</i> cultivada en: Pomina 50% + tierra negra 50%.
t ₅	e ₂ s ₂	<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i> cultivada en: Turba BM2 80% + perlita 10 % + vermiculita 10%.
t ₆	e ₃ s ₂	<i>Paulownia fortunei</i> x <i>Paulownia elongata</i> cultivada en: Pomina 50% + tierra negra 50%.

Nota: A. Cárdenas, 2004

2.4.4.3 Unidad Experimental

La unidad experimental estuvo conformada por una maceta de plástico con tres orificios en la base, llenando las tres cuartas partes de ellas con los sustratos descritos en la tabla 16, con una plántula proveniente de la etapa de enraizamiento *in vitro*.

2.4.4.4 Análisis estadístico

2.4.4.4.1 Diseño experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) dispuesto en arreglo factorial 3x2 (3 especies de *Paulownia* por 2 sustratos) con 10 observaciones.

2.4.4.4.2 Esquema del análisis de la varianza

El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) para el establecimiento de un sustrato se presenta en la tabla 17.

Tabla 17:

ADEVA para la evaluación de la adaptación de plantas obtenidas *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*). INIAP, Cutuglagua – Pichincha 2014.

Fuente de Variación (F de V)	Grados de libertad (GL)
Total	59
Tratamientos	5
Especies (E)	2
Sustrato (S)	1
E x S	2
Error Experimental	54

Nota: A. Cárdenas, 2014

2.4.4.4.3 Análisis funcional

Se realizó la prueba de significancia Tukey al 5% y Diferencia Mínima Significativa (DMS) al 5% para los factores en estudio y sus interacciones que presentaron diferencias estadísticas significativas, empleando el programa de software INFOSTAT.

Modelo matemático usado:

$$Y_{ij} = \mu + E + S + E * S + e$$

Dónde:

μ = Media general

E= Especie

S= Sustrato

E*S= Interacción entre especie y sustrato

e= Error experimental

2.4.4.5 Variables y métodos de evaluación

2.4.4.5.1 Porcentaje de prendimiento (%)

Se registró la adaptación de las vitroplantas en forma visual, mediante la coloración a los 10, 20, 30 y 45 días a partir de la siembra en las macetas ubicadas en el invernadero, se estimó una relación porcentual de la misma por unidad experimental y para todo el ensayo. Evaluando con 0 si la planta está muerta y 1 si está viva.

2.4.4.5.2 Longitud de la planta (cm)

Con la ayuda de una regla milimetrada se midió el tamaño de la planta, desde la base del tallo hasta la yema terminal (punta) a los 10, 20, 30 y 45 días.

2.4.4.6 Manejo específico del Experimento

a) Preparación de sustratos

Se utilizaron dos tipos de sustrato:

- 100% turba que contenía perlita y vermiculita
- Una mezcla entre pomina 50% y tierra negra 50%

Los sustratos fueron autoclavados en doble funda durante 30 minutos, luego se limpiaron las macetas con sablón diluido. Una vez humedecido el sustrato se mezcló con agua destilada, luego se llenaron las macetas. En la figura 19 se esquematiza el proceso.

b) Preparación de explantes

Se lavaron las raíces con agua tibia estéril para retirar el residuo del medio de enraizamiento, luego se colocaron 60 plántulas en el sustrato, se taparon con un vaso plástico transparente, el mismo que poseía un agujero en la parte superior, y se dejaron en el invernadero.

El riego en esta fase se realizó con agua potable limpia, dos veces por semana y se fertilizó cada siete días con stimufol en dosis de 1 g/L de agua. En la figura 19 se esquematiza el proceso.

La fase de aclimatación duró 45 días, a partir de la tercera semana se retiraron los vasos plásticos de cada maceta.

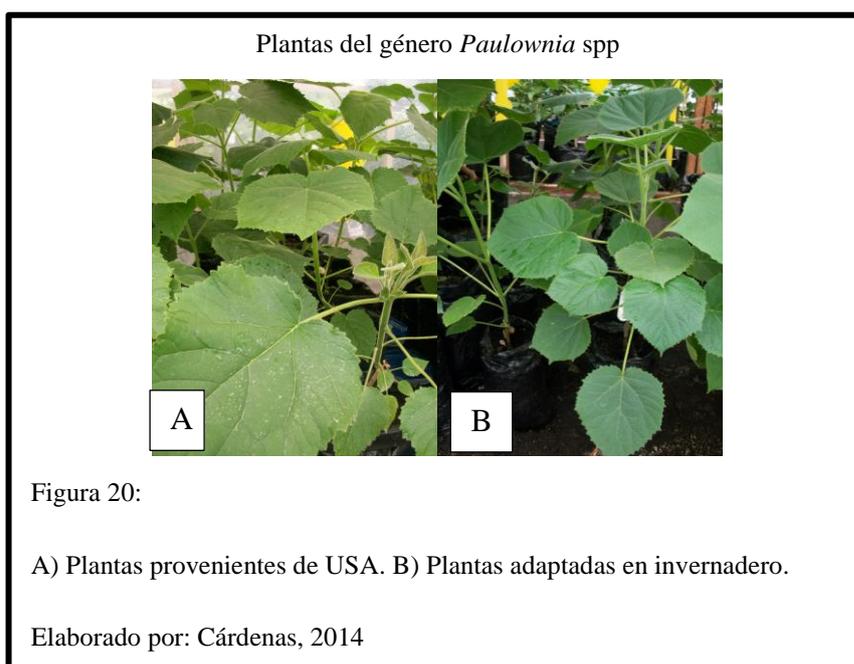


CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Recolección del material vegetal

El material vegetal de *Paulownia*, importado de World Paulownia Institute, Georgia, USA, se adaptó sin ningún problema en uno de los invernaderos de la EESC (figura 20).



3.2 Fase I: Introducción *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).

3.2.1 Porcentaje de contaminación (%)

El establecimiento del material inicial es un reto ya que los factores como la contaminación de los tejidos tanto de manera exógena como endógena (anexo 1), pueden ser una limitante muy grande, al igual que la baja sobrevivencia causada por la oxidación del tejido en el medio de cultivo (Castillo C. , 2007, págs. 59-60).

En el caso de esta investigación se obtuvo una respuesta favorable ya que la sobrevivencia fue de 100% y la contaminación de 0%, utilizando el protocolo 3 (p3) (Agua + fungicidas/bactericidas + PVP + Hipoclorito de sodio al 1% + Ácido

ascórbico + Tween 20). Los brotes obtenidos en esta fase se subcultivaron 2 veces para tener una base de material vegetal suficiente para la siguiente etapa. Es importante la eliminación de los microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) que se encuentran en la superficie del explante y, que en el momento de la siembra y del desarrollo establecen competencia con él, disminuyendo los nutrientes que éste requiere para su desarrollo, y que producen metabolitos tóxicos que afecten su crecimiento y su enraizamiento (Ramos, 2012, págs. 53-59).

Para esta variable la Tabla 18, muestra que los tratamientos T5 (e1p3m1), T6 (e1p3m2), T11 (e2p3m1), T12 (e2p3m2), T17 (e3p3m1) y T18 (e3p3m2) con el 0% de contaminación fueron altamente eficientes para la desinfección de yemas de *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido (*P. fortunei* x *P. elongata*), además se pudo observar que en los tratamientos T1 (e1p1m1), T2 (e1p1m2), T3 (e1p2m1), T4 (e1p2m2), T7 (e2p1m1), T8 (e2p1m2), T9 (e2p2m1), T10 (e2p2m2), T13 (e3p1m1), T14 (e3p1m2), T15 (e3p2m1) y T16 (e3p2m2), la contaminación varía entre el 10-60% debido a la presencia de bacterias y hongos (anexo 5); esto se presentó en tratamientos sin fungicidas ni antibióticos. Botello, Rendón, Gold-Bouchot, & Agraz-Hernández (2005, págs. 34-79), afirman que los fungicidas y bactericidas derivados de cobre como el Phyton (usado en p3), 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. Además como indica (Arauz, 1998, págs. 2-4), los productos a base de cobre pueden prevenir infecciones bacterianas. En esta investigación dicho fungicida y bactericida mostró ser eficiente en la etapa de desinfección dando como resultado un 0% de contaminación con el protocolo de desinfección (p3).

Otro fungicida usado en el protocolo de desinfección (p3) fue benlate, éste actúa de forma sistémica, controlando los hongos patógenos antes de su penetración en la planta (acción preventiva) o bien cuando la infección comienza (acción curativa) (Carmona, 2005, págs. 12-20). Trabajos relacionados con especies forestales como *Salix* sp. y *Aniba perutilis*, 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 & Carrasco, 2002, págs. 1-2). Esta situación evidencia que el Benlate posee un efecto de control sobre una amplia

gama de enfermedades causadas por hongos en diversos cultivos de importancia económica (Pedroza, González, & Téllez, 2007, págs. 33-44).

El antibiótico usado en la presente investigación en el protocolo (*p3*) fue Rifampicina, es bacteriostática o bactericida según las concentraciones que alcance en su lugar de acción y de la susceptibilidad del microorganismo, es eficaz frente a los siguientes microorganismos: *Mycobacterium tuberculosis*; *M. bovis*; *M. kansasii*; *M. marinum*; *M. leprae*; y algunas cepas de *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, y *Legionella pneumophila*. Este antibiótico utilizado en bajas concentraciones (5 mL/L) posiblemente aportó a obtener resultados óptimos de 0% de contaminación, eliminando los contaminantes como bacterias.

Tabla 18:

Porcentajes de contaminación a los 15 días de evaluación para la fase I de establecimiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).

Tratamientos	Codificación	Porcentaje (%)
T1	e ₁ p ₁ m ₁	30
T2	e ₁ p ₁ m ₂	20
T3	e ₁ p ₂ m ₁	30
T4	e ₁ p ₂ m ₂	10
T5	e ₁ p ₃ m ₁	0
T6	e ₁ p ₃ m ₂	0
T7	e ₂ p ₁ m ₁	40
T8	e ₂ p ₁ m ₂	30
T9	e ₂ p ₂ m ₁	60
T10	e ₂ p ₂ m ₂	20
T11	e ₂ p ₃ m ₁	0
T12	e ₂ p ₃ m ₂	0
T13	e ₃ p ₁ m ₁	50
T14	e ₃ p ₁ m ₂	40
T15	e ₃ p ₂ m ₁	40
T16	e ₃ p ₂ m ₂	10
T17	e ₃ p ₃ m ₁	0
T18	e ₃ p ₃ m ₂	0

Descripción de la codificación:

e1= *Paulownia elongata*

e2= *Paulownia fortunei*

e3= *Paulownia* híbrida

p1= Alcohol 70%+ hipoclorito de sodio 1%

p2=Alcohol 70%+ hipoclorito de sodio 4%

p3=Fungicidas/bactericidas + PVP+ hipoclorito de sodio 1%

m1= M&S

m2=M&S+ 0,1mg/L ANA+ 1 mg/L BAP

Nota: A. Cárdenas, 2014

3.2.2 Longitud de brote

El análisis de la varianza para la variable longitud de brote evaluada a los 20 días (tabla 19) detectó alta significancia estadística para los tratamientos, especies,

protocolos de desinfección y medios de cultivo (<0,0001). El promedio de longitud de brote fue de 0,63 cm y el coeficiente de variación de 4,78%, que para este tipo de experimentos es considerado bueno. La alta significación estadística que muestra el análisis de varianza para medios de cultivo y protocolos de desinfección determina, que la variable evaluada no se expresa de la misma manera entre tratamientos atribuyendo la respuesta a la diferencia entre protocolos de desinfección modificados.

El análisis de la varianza para la variable longitud de brote evaluada a los 30 días, (tabla 19), detectó alta significancia estadística para los tratamientos, especies, protocolos de desinfección y medios de cultivo (<0,0001). El promedio de longitud de brote fue de 0,78 cm y el coeficiente de variación de 2,40%, que para este tipo de experimentos es considerado bueno. La alta significación estadística que muestra el análisis de varianza para medios de cultivo y protocolos de desinfección determina, que la variable evaluada no se expresa de la misma manera entre tratamientos.

Tabla 19

ADEVA para la variable longitud de brote (cm) evaluada a los 20 y 30 días para el establecimiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).

F de V	GL	LONGITUD DE BROTE (cm)			
		20 días		30 días	
		Cuadrados medios	p-valor	Cuadrados medios	p-valor
TOTAL	126	-	-	-	-
TRATAMIENTOS	17	0,17	<0,0001	0,07	<0,0001
especies (E)	2	0,26	<0,0001	0,17	<0,0001
protocolo de desinfección (P)	2	0,52	<0,0001	0,11	<0,0001
E x P	4	0,06	<0,0001	0,05	<0,0001
medios de cultivo (M)	1	0,08	<0,0001	0,01	<0,0001
E x M	2	0,06	<0,0001	0,03	<0,0001
M x P	2	0,07	<0,0001	0,04	<0,0001
E x P x M	4	0,08	<0,0001	0,05	<0,0001
ERROR EXPERIMENTAL	109	8,8 E-04		3,5 E-04	
Promedio		0,63		0,78	
CV		4,78%		2,40 %	

Nota: A. Cárdenas, 2014

Longitud de brote a los 20 y 30 días para Especies

Tukey al 5% a los 20 días para especies (tabla 20), identificó tres rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *el*

(*Paulownia elongata*) con un promedio de $0,72 \pm 4,4 E^{-3}$ cm; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *e3* (*Paulownia* híbrida) con un promedio de $0,63 \pm 4,5 E^{-3}$ cm y finalmente en el tercer rango se ubicó *e2* (*Paulownia fortunei*) con un promedio de $0,54 \pm 0,1$ cm.

Tukey al 5% a los 30 días para especies (tabla 20), identificó tres rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *e1* (*Paulownia elongata*) con un promedio de $0,84 \pm 2,8 E^{-3}$ cm; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *e3* (*Paulownia* híbrida) con un promedio de $0,77 \pm 2,9 E^{-3}$ cm y finalmente en el tercer rango se ubicó *e2* (*Paulownia fortunei*) con un promedio de $0,70 \pm 3,8 E^{-3}$ cm. Se pudo evidenciar que el comportamiento entre especies fue diferente, ante la exposición a los protocolos de desinfección y medios de cultivo, pero se mantuvo durante los 20 y 30 días. Sin embargo esta variable (longitud de brote), no es un indicador de eficiencia de los factores en estudio de dicha fase, ya que existió pérdida considerable de material vegetal de entre un 10-50% en los tratamientos T1, T2, T3, T7, T8, T9, T10, T13, T14 y T15 debido a la contaminación y oxidación presente en los ensayos realizados con los protocolos 1 y 2, en cambio con el protocolo 3 todo el material sobrevivió aunque se demoró en alcanzar la longitud media (0,77) (anexo 7).

Longitud de brote a los 20 y 30 días para Protocolos de desinfección

Tukey al 5% a los 20 días para protocolos de desinfección (tabla 20), detectó tres rangos de significancia. En el primer rango se ubicó *p1* en el que se utilizó alcohol al 70% y luego hipoclorito de sodio al 1%, con un promedio de $0,74 \pm 0,01$ cm; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *p2* en el que se utilizó alcohol al 70% y luego hipoclorito de sodio al 4%, con un promedio de $0,64 \pm 0,01$ cm; en tanto que, al final se ubicó *p3* en el que se utilizó Fungicidas, PVP e hipoclorito de sodio al 1%, con promedio de $0,51 \pm 4,1 E^{-3}$ cm.

Tukey al 5% a los 30 días para protocolos de desinfección (tabla 20), detectó dos rangos de significancia. En el primer rango se ubicó *p1* en el que se utilizó alcohol al 70% y luego hipoclorito de sodio al 1%, con un promedio de $0,84 \pm 3,6 E^{-3}$ cm; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *p2* (Alcohol 70% + hipoclorito de sodio 4%) y *p3* (Fungicidas/bactericidas + PVP + hipoclorito de sodio 1%), con un promedio de

$0,74 \pm 3,4 E^{-3}$ cm y $0,73 \pm 2,6 E^{-3}$ cm respectivamente. Se pudo evidenciar que los protocolos *p1* y *p2* fueron los que presentaron un crecimiento mayor con respecto al *p3* (Agua + fungicidas+ PVP + Hipoclorito de sodio 1% + Ácido ascórbico + Tween 20), debido a que la combinación de fungicidas y bactericidas actúan frente a la presencia de hongos y bacterias, de la misma forma retrasó el desarrollo de los explantes.

El protocolo óptimo fue *p1* donde se utilizó alcohol al 70% e hipoclorito de sodio en bajas concentraciones (1%) lo que permitió obtener brotes con una mayor longitud, porque estos agentes tienen mayor oportunidad para llegar al tejido vegetal y hacer efectiva la eliminación de los microorganismo endógenos, sin perjudicar los tejidos del explante (Ministerio del medio ambiente , 2013, págs. 1-2).

Longitud de brote a los 20 y 30 días para Medios de cultivo

Tukey al 5% a los 20 días para medios de cultivo (tabla 20), detectó dos rangos de significancia. En el primer rango se ubicó *m1* (M&S sin reguladores de crecimiento), con un promedio de $0,66 \pm 4,2 E^{-3}$ cm; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *m2* (M&S con 0,1 mg/L ANA y 1 mg/L BAP), con un promedio de $0,60 \pm 4,1 E^{-3}$ cm.

Tukey al 5% a los 30 días para medios de cultivo (tabla 20), detectó dos rangos de significancia. En el primer rango se ubicó *m1* (M&S sin reguladores de crecimiento), con un promedio de $0,78 \pm 2,7 E^{-3}$ cm; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *m2* (M&S con 0,1 mg/L ANA y 1 mg/L BAP), con un promedio de $0,76 \pm 2,6 E^{-3}$ cm.

El medio de cultivo usado *m1* fue estadísticamente diferente a *m2* sin embargo, los dos medios fueron eficientes para las dos especies y un híbrido, ya que no hubo pérdida de material vegetal, es así que *Paulownia* puede desarrollarse en medios de cultivo M&S (Murashige & Skoog, 1962) sin reguladores de crecimiento siempre y cuando se lo utilice completo y con vitaminas (anexo 2).

Yenkateswarlu, Mukhopadhyay, Sreenivasan, & Moses (2001, págs. 594-599), recomiendan sembrar explantes de *P. fortunei* podrían establecerse con éxito en medio M&S con 1 mg/L de BAP. La longitud para las especies del género *Paulownia* puede ser favorecida por los reguladores propios del explante y también

por los adicionados al medio, como se puede observar en la presente investigación se obtuvieron promedios de longitud de explantes similares, utilizando los medios *m1* (M&S sin hormonas) y *m2* (M&S con reguladores en el medio).

Longitud de brote a los 20 y 30 días para la interacción entre Especies x Medios de cultivo x Protocolos de desinfección

Tukey al 5% a los 20 días para la interacción Especies por Medios de cultivo por Protocolos de desinfección (Tabla 20), identificó seis rangos de significancia. En el primer rango se ubicó a *P. elongata* (*e1*) con el *m2* (M&S con 0,1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP) y *p1* (alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 1%), con un promedio de $0,94 \pm 0,01$ cm, el tercer rango se ubicó a *P. híbrida* (*e3*) con el *m2* (M&S con 0,1 mg/L ANA y 1 mg/L BAP) y *p2* (alcohol al 70% e hipoclorito al 4%), con un promedio de $0,72 \pm 0,01$ cm y finalmente se ubicó a *P. fortunei* (*e2*) con el *m1* (M&S sin hormonas) y *p2* (alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 4%), con un promedio de $0,71 \pm 0,01$ cm.

Tukey al 5% a los 30 días para la interacción Especies por Medios de cultivo por Protocolos de desinfección (tabla 20), identificó seis rangos de significancia. En el primer rango se ubicó a *P. elongata* (*e1*) presentó un promedio de $0,97 \pm 0,01$ cm, con las interacciones *m2p1* y *m1p2*, es decir con los medios *m2* (M&S con 0,1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP) y *m1* (M&S sin hormonas) y los protocolos *p1* (alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 1%) y *p2* (alcohol al 70% e hipoclorito al 4%), en el tercer rango se ubicó a *P. híbrida* (*e3*) presentó un promedio de $0,80 \pm 0,01$ cm, con las interacciones *m1p3*, *m2p1* y *m2p2*, es decir con los medios *m2* (M&S con 0,1 mg/L ANA y 1 mg/L BAP) y *m1* (M&S sin hormonas) y los protocolos *p1* (alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 1%) y *p2* (alcohol al 70% e hipoclorito al 4%) y finalmente se ubicó a *P. fortunei* (*e2*) con el *m1* (M&S sin hormonas) y *p1* (alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 1%), con un promedio de $0,86 \pm 0,01$ cm (Anexo 3). Estos resultados posiblemente se deben a que para esta variable existió interacción entre los tres factores de estudio.

Tabla 20:

Promedios y pruebas de significación para la variable longitud de brote evaluada a los 20 y 30 días, para el establecimiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).

Factores	Código	Longitud de brote (cm)	
		20 días	30 días
ESPECIES (E)	e1 (<i>Paulownia elongata</i>)	0,72 ± 4,4E ⁻³ a	0,84 ± 2,8E ⁻³ a
	e2 (<i>Paulownia fortunei</i>)	0,54 ± 0,1 c	0,70 ± 3,8E ⁻³ c
	e3 (<i>Paulownia</i> híbrida)	0,63 ± 4,5E ⁻³ b	0,77 ± 2,9E ⁻³ b
PROTOCOLOS DE DESINFECCIÓN (P)	p1 (alcohol 70%+hipoclorito de sodio 1%)	0,74 ± 0,01 a	0,84 ± 3,6E ⁻³ a
	p2 (Alcohol 70% + hipoclorito de sodio 4%)	0,64 ± 0,01 b	0,74 ± 3,4E ⁻³ b
	p3 (Fungicidas+ PVP+ hipoclorito de sodio 1%)	0,51 ± 4,1E ⁻³ c	0,73 ± 2,6E ⁻³ b
MEDIO DE CULTIVO (M)	m1 (M&S)	0,66 ± 4,2E ⁻³ a	0,78 ± 2,7E ⁻³ a
	m2 (M&S+0,1 mg/L ANA+ 1 mg/L BAP)	0,60 ± 4,1E ⁻³ b	0,76 ± 2,6E ⁻³ b
E x P	e1p1	0,87 ± 0,01 a	0,92 ± 5,0E ⁻³ a
	e1p2	0,72 ± 0,01 b	0,85 ± 4,9E ⁻³ b
	e1p3	0,57 ± 0,01 d	0,76 ± 4,6E ⁻³ c
	e2p1	0,70 ± 0,01 b	0,83 ± 0,01 b
	e2p2	0,49 ± 0,01 e	0,60 ± 0,01 e
	e2p3	0,44 ± 0,01 f	0,67 ± 4,6E ⁻³ d
	e3p1	0,65 ± 0,01 c	0,76 ± 0,01 c
	e3p2	0,71 ± 0,01 b	0,77 ± 4,9E ⁻³ c
E x M	e1m1	0,79 ± 0,01 a	0,88 ± 4,0E ⁻³ a
	e1m2	0,65 ± 0,01 b	0,81 ± 3,9E ⁻³ b
	e2m1	0,57 ± 0,01 d	0,71 ± 0,01 d
	e2m2	0,51 ± 0,01 e	0,69 ± 0,01 e
	e3m1	0,62 ± 0,01 c	0,75 ± 4,2E ⁻³ d
	e3m2	0,63 ± 0,01 bc	0,78 ± 3,8E ⁻³ c
E x M x P	e1m1p1	0,80 ± 0,01 b	0,87 ± 0,01 b
	e1m1p2	0,92 ± 0,01 a	0,97 ± 0,01 a
	e1m1p3	0,63 ± 0,01 d	0,80 ± 0,01 c
	e1m2p1	0,94 ± 0,01 a	0,97 ± 0,01 a
	e1m2p2	0,52 ± 0,01 e	0,72 ± 0,01 d
	e1m2p3	0,50 ± 0,01 e	0,72 ± 0,01 d
	e2m1p1	0,71 ± 0,01 c	0,86 ± 0,01 b
	e2m1p2	0,48 ± 0,02 e	0,53 ± 0,01 f
	e2m1p3	0,51 ± 0,01 e	0,73 ± 0,01 d
	e2m2p1	0,68 ± 0,02 cd	0,79 ± 0,01 c
	e2m2p2	0,51 ± 0,01 e	0,66 ± 0,01 e
	e2m2p3	0,36 ± 0,01 f	0,62 ± 0,01 e
	e3m1p1	0,62 ± 0,01 d	0,73 ± 0,01 d
	e3m1p2	0,71 ± 0,01 c	0,73 ± 0,01 d
	e3m1p3	0,53 ± 0,01 e	0,80 ± 0,01 c
e3m2p1	0,67 ± 0,01 cd	0,80 ± 0,01 c	
e3m2p2	0,72 ± 0,01 c	0,80 ± 0,01 c	
e3m2p3	0,50 ± 0,01 e	0,72 ± 0,01 d	

Tukey 5%
DMS 5%

Nota: A. Cárdenas, 2014

3.2.3 Porcentaje de brotación (%)

En esta variable se hizo una evaluación porcentual de la brotación a los 10, 20 y 30 días.

Porcentaje de brotación a los 10 días

En la tabla 21, se observa que el mayor porcentaje de brotación (100%), corresponde a los tratamientos T1 (e1p1m1), T4 (e1p2m2), T16 (e3p2m2), T17 (e3p3m1) y T18 (e3p3m2) y el menor porcentaje (20%) corresponde al tratamiento T8 (e2p1m2).

Porcentaje de brotación a los 20 días

En esta evaluación, tabla 21, la brotación para los tratamientos T17 (e3p3m2) y T18 (e3p3m2) se mantuvo en el 100%, en cambio para los tratamientos T1 (e1p1m1), T4 (e1p2m2) y T16 (e3p2m2) disminuyó el porcentaje de brotación debido a la contaminación y oxidación presentes en los tratamientos que provocó la muerte de los explantes, en cambio para los tratamientos T11 (e2p3m1) y T5 (e1p3m1) aumentó el porcentaje de brotación a 100% debido a que a los 20 días aumentó la tasa de crecimiento.

Porcentaje de brotación a los 30 días

Para esta evaluación, (tabla 21; anexo 4), los tratamientos T5 (e1p3m1), T11 (e2p3m1), T17 (e3p3m2) y T18 (e3p3m2), la brotación se mantuvo en el 100% de igual manera para el tratamiento T8 (e2p1m2) en el 20%. Al comparar el efecto del medio de cultivo M&S en la etapa de establecimiento con lo obtenido por Aguilar et al. (2001), quienes utilizaron WPM (Woody Plant Medium) para leñosas al 100% complementado con vitaminas, 1 mg/L BAP y 0,5 mg/L de ANA se obtuvo un 70% de brotación, en cambio en el presente estudio con M&S al 100% complementado con vitaminas sin reguladores de crecimiento, se logró alcanzar en los tratamientos T5, T11, T17 y T18 un 100% de brotación.

Una posible causa de los resultados desfavorables en el medio (*m2*), ocurre por una saturación hormonal, pues investigaciones anteriores afirman que altas concentraciones de citoquininas en el medio de iniciación, pueden inhibir la brotación (Miranda, 2014, págs. 65-88), por ende se pueden apreciar los valores más bajos.

En algunos tratamientos que se utilizaron reguladores de crecimiento (0,1 mg/L ANA y 1 mg/L BAP) se observó la formación de callo, corroborando lo afirmado por Ipekci, Atinkut, Kazan, Bajrovic, & Gozukirmizi (2001, págs. 113-115), quienes generaron callo embriogénico a partir de segmentos internodales de *P. elongata*, utilizando como medio (4 mg/L BA + 0,2 mg/L ANA) pero esto es útil para emplearse en el sistema de regeneración por embriogénesis y organogénesis indirecta. Según dicha investigación no es necesario agregar para esta etapa reguladores de crecimiento, para evitar la formación de callo si se quiere partir por una organogénesis directa sin pasar por callo.

Se modificó el protocolo de desinfección 2 desarrollado por Ipekci, Atinkut, Kazan, Bajrovic, & Gozukirmizi (2001, págs. 113-115), donde se presentó una frecuencia de regeneración de brotes axilares y adventicia de 93,7%, pero para el presente estudio se obtuvo 70,56% de brotación debido a que persistía la contaminación.

Otro aspecto que se debería tomar en cuenta frente a los resultados obtenidos en el experimento, es que el tamaño del explante introducido fue el apropiado; pues según (Roca & Mroginski, 1991, págs. 969-970), el tamaño de los explantes es muy importante para el establecimiento de los cultivos *in vitro*, cuanto más grande sean los explantes, mayores serán las posibilidades de obtener proliferaciones vegetativas, aunque ello traerá mayores probabilidades de contaminación con *in vitro* patógenos; para el presente estudio se tomaron explantes de 1,5 a 2 cm de longitud, siendo una posible causa de sobrevivencia de los explantes. Cabe mencionar que la edad del material de inicio también es importante como lo indican Clapa, Fira, Manuela, Vasu, & Buduroi (2014, págs. 6-14), quienes recomiendan utilizar explantes jóvenes que consten de yemas axilares, en esta investigación se utilizó material vegetal que provino de distintas plantas madre en diferente estado fisiológico y posiblemente en algunos tratamientos se incluyó material proveniente de una planta madre joven, donde la respuesta *in vitro* fue adecuada, debido a que los tejidos están en plena división celular, a diferencia de plantas viejas, como reportó Krikorian (1991, págs. 95-125), al aseverar que un factor preponderante en la propagación *in vitro* es la juvenilidad, se determinó que los tejidos con mayor posibilidad para generar brotes vía organogénesis directa serían segmentos foliares, entrenudos y pecíolos; los cuales

han sido probados en otras especies como lo encontrado por Ipecki & Gozukirmizi (2003, págs. 16-24) y por Bergmann & Moon (1997, págs. 315-317). Por otra parte, el medio base usado fue el Murashigue Skoog, que fue probado en todos los trabajos realizados en el género *Paulownia* y la combinación de reguladores de crecimiento evaluadas fueron para organogénesis directa BA y ANA y TDZ, para organogénesis indirecta y caulogénesis, en diferentes concentraciones y combinaciones, como los usados en el presente estudio. Estos reguladores de crecimiento fueron los que mejor respuesta dieron en diferentes investigaciones como las realizadas por Ipecki & Gozukirmizi (2003, págs. 16-24) y, por Bergmann & Moon (1997, págs. 315-317), para ambas vías de organogénesis.

Tabla 21:

Porcentajes de brotación a los 10, 20 y 30 días de evaluación para la fase I de establecimiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).

Tratamientos	Codificación	Porcentaje (%)		
		10 días	20 días	30 días
T1	e ₁ p ₁ m ₁	100	70	70
T2	e ₁ p ₁ m ₂	50	70	70
T3	e ₁ p ₂ m ₁	40	60	60
T4	e ₁ p ₂ m ₂	100	90	90
T5	e ₁ p ₃ m ₁	90	100	100
T6	e ₁ p ₃ m ₂	80	70	70
T7	e ₂ p ₁ m ₁	70	60	60
T8	e ₂ p ₁ m ₂	20	20	20
T9	e ₂ p ₂ m ₁	30	20	20
T10	e ₂ p ₂ m ₂	50	80	80
T11	e ₂ p ₃ m ₁	60	100	100
T12	e ₂ p ₃ m ₂	90	70	70
T13	e ₃ p ₁ m ₁	50	50	50
T14	e ₃ p ₁ m ₂	60	60	60
T15	e ₃ p ₂ m ₁	60	60	60
T16	e ₃ p ₂ m ₂	100	90	90
T17	e ₃ p ₃ m ₁	100	100	100
T18	e ₃ p ₃ m ₂	100	100	100

Descripción de la codificación:

e1= *Paulownia elongata*

p1= Alcohol 70%+ hipoclorito de sodio 1%

m1= M&S

e2= *Paulownia fortunei*

p2=Alcohol 70%+ hipoclorito de sodio 4%

m2=M&S+ 0,1mg/L ANA+ 1 mg/L BAP

e3= *Paulownia* híbrida

p3=Fungicidas/bactericidas+ PVP+ hipoclorito de sodio 1%

Nota: A. Cárdenas, 2014

3.2.4 Porcentaje de oxidación (%)

Para esta variable la tabla 22, muestra que los tratamientos T1 (e₁p₁m₁), T3 (e₁p₂m₁), T4 (e₁p₂m₂), T5 (e₁p₃m₁), T6 (e₁p₃m₂), T9 (e₂p₂m₁), T10 (e₂p₂m₂),

T11 (e2p3m1), T12 (e2p3m2), T13 (e3p1m1), T14 (e3p1m2), T15 (e3p2m1), T16 (e3p2m2), T17 (e3p3m1) y T18 (e3p3m2), con el 0% de oxidación fueron altamente eficientes para el establecimiento *in vitro* de *P. elongata*, *P. fortunei* y *P. híbrida* (ver anexo 6).

Los tratamientos T2 (e1p1m2) y T7 (e2p1m1) mostraron un 10% de oxidación, mientras que T8 (e2p1m2) alcanzó hasta un 50%. La oxidación no se presentó en la mayoría de tratamientos, una de las posibles causas que produjo este fenómeno pudo ser el uso de agentes desinfectantes, según (Azofeifa, 2009, págs. 153-175), el hipoclorito de sodio tiene un gran poder oxidativo, el cual puede provocar oscurecimiento de los explantes cultivados *in vitro*, una alternativa para evitar la oxidación es la utilización de concentraciones bajas del agente desinfectante u optar por otro tipo de desinfectantes menos agresivos, otra alternativa es escindir el tejido lesionado al momento de la desinfección para eliminar sustancias fenólicas que produce el explante.

La mayoría de tratamientos empleados para esta fase no presentaron oxidación de explantes, resultando eficiente el uso de los protocolos 1,2 y 3. Esto también se puede atribuir a que la introducción de explantes al medio de cultivo se lo hizo de una forma rápida para que no queden expuestos demasiado tiempo al oxígeno del ambiente para que éste no pueda oxidarlos. Factores ambientales como: intensidad de luz, cortes, herbicidas, senescencia, patógenos, metales pesados, lesiones, sustancias abrasivas pueden desencadenar el estrés oxidativo y nitrosativo (Bray, Bai ley-Serres, & Weretilnyk, (2000, págs. 1158-1203); Pompeu, Vitorello, & Azevedo, (2008, págs. 548-552).

En el caso particular del cultivo de tejidos *in vitro*, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo (George, 1993, págs. 130-143).

Tabla 22:

Porcentajes de oxidación a los 15 días de evaluación para la fase I de establecimiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*)

Tratamientos	Codificación	Porcentaje (%)
T1	e ₁ p ₁ m ₁	0
T2	e ₁ p ₁ m ₂	10
T3	e ₁ p ₂ m ₁	0
T4	e ₁ p ₂ m ₂	0
T5	e ₁ p ₃ m ₁	0
T6	e ₁ p ₃ m ₂	0
T7	e ₂ p ₁ m ₁	10
T8	e ₂ p ₁ m ₂	50
T9	e ₂ p ₂ m ₁	0
T10	e ₂ p ₂ m ₂	0
T11	e ₂ p ₃ m ₁	0
T12	e ₂ p ₃ m ₂	0
T13	e ₃ p ₁ m ₁	0
T14	e ₃ p ₁ m ₂	0
T15	e ₃ p ₂ m ₁	0
T16	e ₃ p ₂ m ₂	0
T17	e ₃ p ₃ m ₁	0
T18	e ₃ p ₃ m ₂	0

Descripción de la codificación:

e1= *Paulownia elongata*

e2= *Paulownia fortunei*

e3= *Paulownia* híbrida

p1= Alcohol 70%+ hipoclorito de sodio 1%

p2=Alcohol 70%+ hipoclorito de sodio 4%

p3= Fungicidas/ bactericidas + PVP+ hipoclorito de sodio 1%

m1= M&S

m2=M&S+ 0,1 mg/L ANA+ 1 mg/L BAP

Nota: A. Cárdenas, 2014

3.3 Fase II: Multiplicación *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) bajo el sistema convencional e inmersión temporal.

El objetivo de la fase de multiplicación *in vitro* fue obtener una mayor cantidad de brotes a partir del explante primario, para *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) tanto en el sistema convencional como en el Sistema de Inmersión Temporal.

3.3.1 Sistema convencional

3.3.1.1 Altura de brotes

El análisis de la varianza para la variable altura de brotes a los 10 días (tabla 23) detectó alta significación estadística para los tratamientos, especies y medios de cultivo (<0,0001) y para su interacción M x E (0,0006). El promedio de altura de brotes fue de 1,52 cm y el coeficiente de variación de 14,29 %, que para este tipo de experimentos es considerado muy bueno. La alta significación estadística que muestra el análisis de varianza para medios de cultivo determina, que la variable evaluada no se expresa de la misma manera entre tratamientos, atribuyendo esta respuesta a la adición y concentración de varios tipos de hormonas y el uso de sales basales.

El análisis de la varianza para la variable altura de brotes a los 20 días (tabla 23) de igual manera se observa alta significación estadística para medios de cultivo (<0,0001) y especies (<0,0001). El promedio de la altura de brotes fue de 3,94 cm y el coeficiente de variación de 6,36%, que para este tipo de experimento es considerado óptimo.

El análisis de la varianza para la variable altura de brotes a los 30 días (tabla 23) se observa alta significación estadística, para medios de cultivo (<0,0001) y especies (<0,0001), el promedio de altura de brote fue de 6,54 cm y el coeficiente de variación de 3,90%, considerado óptimo (anexo 8).

Tabla 23:

ADEVA para la variable altura de brotes (cm) evaluada para la multiplicación *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) bajo el sistema convencional.

F de V	10 días			20 días			30 días		
	(GL)	Cuadrados medios	p-valor	(GL)	Cuadrados medios	p-valor	(GL)	Cuadrados medios	p-valor
TOTAL	119			119			119		
TRATAMIENTOS	11	2,08	<0,0001	11	12,37	<0,0001	11	23,38	<0,0001
Especies (E)	2	2,67	<0,0001	2	16,72	<0,0001	2	46,56	<0,0001
Medios de Cultivo (M)	3	5,44	<0,0001	3	22,88	<0,0001	3	43,05	<0,0001
E x M	6	0,20	0,0006	6	5,66	<0,0001	6	5,81	<0,0001
ERROR EXPERIMENTAL	108	0,05		108	0,06		108	0,07	
Promedio	1,52			3,94			6,54		
CV	14,29%			6,36%			3,90%		

Nota: A. Cárdenas, 2014

Altura de brote a los 10, 20 y 30 días para especies

Tukey al 5% a los 10 días para especies (tabla 24), identificó tres rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *e1* (*Paulownia elongata*) con un promedio de $1,76 \pm 0,03$ cm; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *e2* (*Paulownia fortunei*) con un promedio de $1,56 \pm 0,03$ cm y finalmente en el tercer rango se ubicó *e3* (*Paulownia* híbrida) con un promedio de $1,25 \pm 0,03$ cm.

Tukey al 5% a los 20 días para especies (tabla 24), identificó dos rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *e1* (*Paulownia elongata*) con un promedio de $4,69 \pm 0,04$ cm; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *e2* (*Paulownia fortunei*) con un promedio de $3,54 \pm 0,04$ cm y *e3* (*Paulownia* híbrida) con un promedio de $3,60 \pm 0,04$ cm.

Tukey al 5% a los 30 días para especies (tabla 24), identificó tres rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *e1* (*Paulownia elongata*) con un promedio de $7,47 \pm 0,04$ cm; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *e3* (*Paulownia* híbrida) con un promedio de $6,78 \pm 0,04$ cm y

finalmente en el tercer rango se ubicó *e2* (*Paulownia fortunei*) con un promedio de $5,35 \pm 0,04$ cm.

Altura de brote a los 10, 20 y 30 días para Medios de cultivo

Tukey al 5% a los 10 días para medios de cultivo (tabla 24), detectó tres rangos de significancia. En el primer rango se ubicó *m3* (M&S con 0,2 mg/L BAP), con un promedio de $2,12 \pm 0,04$ cm; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *m4* (M&S con 0,1 mg/L ANA y 1 mg/L BAP), con un promedio de $1,42 \pm 0,04$ cm y *m2* (M&S con 2 mg/L BAP y 0,05 mg/L ANA), con un promedio de $1,44 \pm 0,04$ cm y finalmente se ubicó en el tercer rango a *m1* (M&S con 4 mg/L BAP y 0,2 mg/L ANA), con un promedio de $1,12 \pm 0,04$ cm.

Tukey al 5% a los 20 días para medios de cultivo (tabla 24), detectó tres rangos de significancia. En el primer rango se ubicó *m3* (M&S con 0,2 mg/L BAP), con un promedio de $5,24 \pm 0,05$ cm, en el segundo rango se ubicó *m1* (M&S con 4 mg/L BAP y 0,2 mg/L ANA), con un promedio de $3,67 \pm 0,05$ cm, en tanto que, en el tercer rango se ubicó *m4* (M&S con 0,1 mg/L ANA y 1 mg/L BAP), con un promedio de $3,47 \pm 0,05$ cm y *m2* (M&S con 2 mg/L BAP y 0,05 mg/L ANA), con un promedio de $3,39 \pm 0,05$ cm.

Tukey al 5% a los 30 días para medios de cultivo (tabla 24), detectó cuatro rangos de significancia. En el primer rango se ubicó *m3* (M&S con 0,2 mg/L BAP), con un promedio de $8,04 \pm 0,05$ cm, en el segundo rango se ubicó *m1* (M&S con 4 mg/L BAP y 0,2 mg/L ANA), con un promedio de $6,72 \pm 0,05$ cm, en tanto que, en el tercer rango se ubicó *m2* (M&S con 2 mg/L BAP y 0,05 mg/L ANA), con un promedio de $6,24 \pm 0,05$ cm y *m4* (M&S con 0,1 mg/L ANA y 1 mg/L BAP), con un promedio de $5,15 \pm 0,05$ cm.

Altura de brote a los 10, 20 y 30 días para la interacción entre Especies y Medios de cultivo

Tukey al 5% a los 10 días para la interacción Especies por Medios de cultivo (tabla 24), identificó siete rangos de significancia, ubicando a *m3* como el medio de cultivo óptimo para *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido en el que se utilizó M&S suplementado con 0,2 mg/L de BAP. En el primer rango se ubicó a *P. elongata*, con

un promedio de $2,32 \pm 0,07$ cm, luego se ubicó a *P. fortunei*, con un promedio de $2,21 \pm 0,07$ cm y finalmente se ubicó a *P. híbrida*, con un promedio de $1,84 \pm 0,07$ cm.

Tukey al 5% a los 20 días para la interacción Especies por Medios de cultivo (tabla 24), identificó seis rangos de significancia, ubicando a *m3* como el medio de cultivo óptimo para *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido en el que se utilizó M&S suplementado con 0,2 mg/L de BAP. En el primer rango se ubicó a *P. elongata*, con un promedio de $6,23 \pm 0,08$ cm, luego se ubicó a *P. híbrido*, con un promedio de $5,22 \pm 0,08$ cm y finalmente se ubicó a *P. fortunei*, con un promedio de $4,27 \pm 0,08$ cm.

Tukey al 5% a los 30 días para la interacción Especies por Medios de cultivo (tabla 24), identificó siete rangos de significancia, ubicando a *m3* como el medio de cultivo óptimo para *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido en el que se utilizó M&S suplementado con 0,2 mg/L de BAP. En el primer rango se ubicó a *P. híbrido*, con un promedio de $9,53 \pm 0,08$ cm, luego se ubicó a *P. elongata*, con un promedio de $8,34 \pm 0,08$ cm y finalmente se ubicó a *P. fortunei*, con un promedio de $6,24 \pm 0,08$ cm (Anexo 3).

Clapa, Fira, Manuela, Vasu, & Buduroi (2014, págs. 6-14), utilizaron M&S con 0,5 mg/L de BAP, donde obtuvieron un promedio de 7,17 cm para *P. elongata*, en el presente estudio utilizando M&S suplementado con 0,2 mg/L BAP, se obtuvo similares resultados con un promedio de 8,34 cm, por lo que el uso de bajas concentraciones de BAP da respuesta óptima al crecimiento de *P. elongata*.

Clapa, Fira, Manuela, Vasu, & Buduroi (2014, págs. 6-14), utilizaron MS suplementado con 1 mg/L mT (meta-topolina) para *P. fortunei*, donde obtuvieron un promedio de 6,25 cm, mientras que para el presente estudio utilizando M&S suplementado con 0,2 mg/L BAP, se obtuvo un promedio de 6,24 cm, se obtuvo una respuesta similar a la del autor, por lo que para dicha especie se puede utilizar M&S suplementado con cualquiera de los dos reguladores de crecimiento, ya que se obtienen valores óptimos.

Se observó en la presente investigación que el BAP tuvo una influencia significativa tanto en la multiplicación como en la elongación de los brotes, a medida que se

incrementó la concentración del BAP existió una disminución progresiva en la longitud del brote, existiendo superioridad del medio (m3) con respecto de los tratamientos, lo cual parece indicar que al aumentar la concentración de BAP esta influye en mayor medida sobre la multiplicación y no sobre el alargamiento celular.

Tabla 24:

Promedios y pruebas de significación para la variable altura de brotes para la evaluación a los 10, 20 y 30 días de multiplicación *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) bajo el sistema convencional.

Factores	Código	Altura de brote (cm)		
		10 días	20 días	30 días
ESPECIES (E)	e1 (<i>Paulownia elongata</i>)	1,76 ± 0,03 a	4,69 ± 0,04 a	7,47 ± 0,04 a
	e2 (<i>Paulownia fortunei</i>)	1,56 ± 0,03 b	3,54 ± 0,04 b	5,35 ± 0,04 c
	e3 (<i>Paulownia</i> híbrida)	1,25 ± 0,03 c	3,60 ± 0,04 b	6,78 ± 0,04 b
MEDIO DE CULTIVO (M)	m1 (M&S+ 4 mg/L BAP + 0,2 mg/L ANA)	1,12 ± 0,04 c	3,67 ± 0,05 b	6,72 ± 0,05 b
	m2 (M&S+ 2 mg/L BAP+ 0,05 mg/L ANA)	1,44 ± 0,04 b	3,39 ± 0,05 c	6,24 ± 0,05 c
	m3 (M&S+ 0,2 mg/L BAP)	2,12 ± 0,04 a	5,24 ± 0,05 a	8,04 ± 0,05 a
	m4 (M&S+ 0,1 mg/L ANA+ 1 mg/L BAP)	1,42 ± 0,04 b	3,47 ± 0,05 c	5,15 ± 0,05 d
E x M	e1m1	1,32 ± 0,07 def	5,35 ± 0,08 b	8,17 ± 0,08 b
	e1m2	1,52 ± 0,07 cd	3,30 ± 0,08 e	7,28 ± 0,08 c
	e1m3	2,32 ± 0,07 a	6,23 ± 0,08 a	8,34 ± 0,08 b
	e1m4	1,88 ± 0,07 b	3,87 ± 0,08 d	6,09 ± 0,08 de
	e2m1	1,19 ± 0,07 ef	3,22 ± 0,08 e	5,82 ± 0,08 e
	e2m2	1,52 ± 0,07 de	3,42 ± 0,08 e	5,19 ± 0,08 f
	e2m3	2,21 ± 0,07 a	4,27 ± 0,08 c	6,24 ± 0,08 d
	e2m4	1,34 ± 0,07 def	3,25 ± 0,08 e	4,17 ± 0,08 g
	e3m1	0,84 ± 0,07 g	2,43 ± 0,08 f	6,17 ± 0,08 de
	e3m2	1,28 ± 0,07 def	3,46 ± 0,08 e	6,24 ± 0,08 d
	e3m3	1,84 ± 0,07 bc	5,22 ± 0,08 b	9,53 ± 0,08 a
	e3m4	1,03 ± 0,07 fg	3,28 ± 0,08 e	5,18 ± 0,08 f

Tukey 5%
DMS 5%

Nota: A. Cárdenas, 2014

3.3.1.2 Número de nudos

En el análisis de la varianza para esta variable (tabla 25) se detectó alta significancia estadística para medios de cultivo (<0,0001), especies (<0,0001) y su interacción E x M (<0,0001); el promedio del número de nudos por explante fue de 7,93; 17,53 y 28,10 a los 10, 20 y 30 días respectivamente.

El coeficiente de variación fue de 13,24%; 6,11% y 3,79% a los 10, 20 y 30 días respectivamente, considerándose óptimo para este tipo de experimento.

Tabla 25

ADEVA para la variable número de nudos evaluada a los 10, 20 y 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) bajo el sistema convencional.

F de V	10 días			20 días			30 días		
	(GL)	Cuadrados medios	p-valor	(GL)	Cuadrados medios	p-valor	(GL)	Cuadrados medios	p-valor
TOTAL	119			119			119		
TRATAMIENTOS	11	34,93	<0,0001	11	240,90	<0,0001	11	342,95	<0,0001
Especies (E)	2	51,73	<0,0001	2	511,23	<0,0001	2	472,50	<0,0001
Medios de Cultivo (M)	3	59,82	<0,0001	3	444,53	<0,0001	3	602,09	<0,0001
E x M	6	16,89	<0,0001	6	48,97	<0,0001	6	170,19	<0,0001
ERROR EXPERIMENTAL	108	1,10		108	1,15		108	1,13	
Promedio	7,93			17,53			28,10		
CV	13,24%			6,11%			3,79%		

Nota: A. Cárdenas, 2014

Número de nudos a los 10, 20 y 30 días para Especies

Tukey al 5% a los 10 días para especies (tabla 26), identificó tres rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *e1* (*Paulownia elongata*) con un promedio de $9,20 \pm 0,17$; en el segundo rango se ubicó *e3* (*Paulownia* híbrida) con un promedio de $7,60 \pm 0,17$ y finalmente en el tercer rango se ubicó *e2* (*Paulownia fortunei*) con un promedio de $7,00 \pm 0,17$.

Tukey al 5% a los 20 días para especies (tabla 26), identificó tres rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *e1* (*Paulownia elongata*) con un promedio de $20,10 \pm 0,17$; en el segundo rango se ubicó *e3* (*Paulownia* híbrida) con un promedio de $19,05 \pm 0,17$ y *e2* (*Paulownia fortunei*) con un promedio de $13,45 \pm 0,17$.

Tukey al 5% a los 30 días para especies (tabla 26), identificó tres rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *e3* (*Paulownia* híbrida) con un promedio de $31,10 \pm 0,17$, en el segundo rango se ubicó *e1* (*Paulownia elongata*) con un promedio de $28,85 \pm 17$ y finalmente en el tercer rango se ubicó *e2* (*Paulownia fortunei*) con un promedio de $24,35 \pm 0,17$.

Número de nudos a los 10, 20 y 30 días para Medios de cultivo

Tukey al 5% a los 10 días para medios de cultivo (tabla 26), detectó tres rangos de significancia. En el primer rango se ubicó *m3* (M&S con 0,2 mg/L BAP), con un promedio de $9,93 \pm 0,19$; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *m1* (M&S con 4 mg/L BAP y 0,2 mg/L ANA), con un promedio de $7,87 \pm 0,19$, *m2* (M&S con 2 mg/L BAP y 0,05 mg/L ANA), con un promedio de $7,20 \pm 0,19$ y finalmente se ubicó en el tercer rango a *m4* (M&S con 0,1 mg/L ANA y 1 mg/L BAP), con un promedio de $6,73 \pm 0,19$.

Tukey al 5% a los 20 días para medios de cultivo (tabla 26), detectó cuatro rangos de significancia. En el primer rango se ubicó *m3* (M&S con 0,2 mg/L BAP), con un promedio de $21,60 \pm 0,20$, en el segundo rango se ubicó *m1* (M&S con 4 mg/L BAP y 0,2 mg/L ANA), con un promedio de $19,80 \pm 0,20$, en el tercer rango se ubicó *m2*

(M&S con 2 mg/L BAP y 0,05 mg/L ANA), con un promedio de $15,53 \pm 0,20$ y *m4* (M&S con 0,1 mg/L ANA y 1 mg/L BAP), con un promedio de $13,20 \pm 0,20$.

Tukey al 5% a los 30 días para medios de cultivo (tabla 26), detectó tres rangos de significancia. En el primer rango se ubicó *m3* (M&S con 0,2 mg/L BAP), con un promedio de $33,80 \pm 0,19$, en el segundo rango se ubicó *m1* (M&S con 4 mg/L BAP y 0,2 mg/L ANA), con un promedio de $28,20 \pm 0,19$, y *m2* (M&S suplementado con 2 mg/L BAP y 0,05 mg/L ANA), con un promedio de $27,53 \pm 0,19$ y en el tercer rango se ubicó a *m4* (M&S suplementado con 0,1 mg/L ANA y 1 mg/L BAP), con un promedio de $22,87 \pm 0,19$.

Aguilar, Villalobos, & Salgado (2001, págs. 32-78), afirman que después de la fase de establecimiento, la inducción de los brotes adventicios del género *Paulownia* requiere de una combinación nutricional y hormonal específica, por lo que los brotes neoformados deben recultivarse, induciéndose el proceso de multiplicación y considerando que la concentración de los nutrientes y sacarosa influyen en el número y desarrollo de los brotes o nudos, ellos transfirieron los explantes a un medio WPM al 50% con 0,2 mg/L de AIB (ácido indolbutírico) y 0,6 mg/L de BA (Benciladenina) con lo que estimularon la aparición y desarrollo de los brotes, esto lo hicieron para el cultivo de *Paulownia tomentosa*, esto respalda a lo obtenido en la presente investigación, ya que el uso del medio *m3* (M&S con 0,2 mg/L de BAP), resultó ser el medio óptimo para *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido.

La proliferación de los brotes axilares se logró con la adición de citoquininas en el medio de cultivo para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas que se encuentran en la base de las hojas. El uso de citoquininas es generalizado en los medios de propagación, variando su concentración en dependencia del balance endógeno de auxinas y citoquininas en los explantes, según lo comentan Hu y Wang mencionados por Zamora & Juárez (2008, págs. 47-76).

Número de nudos a los 20 y 30 días para la interacción entre Especies y Medios de cultivo

Tukey al 5% a los 10 días para la interacción Especies por Medios de cultivo (tabla 26), identificó cinco rangos de significancia, ubicando a *m3* como el medio de cultivo óptimo para *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido, en el que se utilizó M&S suplementado con 0,2 mg/L de BAP. En el primer rango se ubicó a *P. elongata*, con un promedio de $11,60 \pm 0,33$, luego se ubicó a *P. híbrida*, con un promedio de $9,20 \pm 0,33$ y finalmente se ubicó a *P. fortunei*, con un promedio de $9,00 \pm 0,33$ nudos por explante.

Tukey al 5% a los 20 días para la interacción Especies por Medios de cultivo (tabla 26), identificó siete rangos de significancia, ubicando a *m3* como el medio de cultivo óptimo para *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido en el que se utilizó M&S suplementado con 0,2 mg/L de BAP. En el primer rango se ubicó a *P. híbrida*, con un promedio de $25,00 \pm 0,34$, luego se ubicó a *P. elongata*, con un promedio de $23,00 \pm 0,34$ y finalmente se ubicó a *P. fortunei*, con un promedio de $16,80 \pm 0,34$ nudos por explante.

Tukey al 5% a los 30 días para la interacción Especies por Medios de cultivo (tabla 26), se identificó siete rangos de significancia, ubicando a *m3* como el medio de cultivo óptimo para *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido en el que se utilizó M&S suplementado con 0,2 mg/L de BAP. En el primer rango se ubicó a *P. híbrido*, con un promedio de $35,40 \pm 0,34$, luego se ubicó a *P. elongata*, con un promedio de $35,00 \pm 0,34$ y finalmente se ubicó a *P. fortunei*, con un promedio de $31,00 \pm 0,34$ nudos por explante (anexo 9).

Zayova (2011, págs. 422-425), obtuvo un 95% de brotes múltiples con un número de 8,2 brotes para *P. elongata* utilizando un medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 2 mg/L de BAP (6-bencilaminopurina) en combinación con una baja concentración de auxina 0,05 mg/L de ANA (ácido naftalacético) durante cuatro semanas; en el presente estudio el medio de cultivo *m3* (M&S+ 6 g/L agar+ 30 g/L azúcar+ 0,2 mg/L BAP), superó lo obtenido por Zayova (2011, págs. 422-425), logrando la obtención de 35 nudos/brote.

El medio de cultivo *ml* (M&S+ 4 mg/L BAP+ 0,2 mg/L ANA), utilizado en el presente estudio obtuvo una gran cantidad de brotes ($28,20 \pm 0,19$), pero existió la formación de callo en su base; al respecto Castillo, Gutiérrez, Buenrostro, & Cetina (2012, págs. 41-49), mencionan que utilizando dicho medio, generaron un 83% de segmentos nodales; Ipekci, Atinkut, Kazan, Bajrovic, & Gozukirmizi (2001, págs. 113-115), generaron callo embriogénico a partir de segmentos internodales de *P. elongata*, de ahí que se infiera que este tipo de tejido tiene posibilidades para utilizarse en el sistema de regeneración por embriogénesis y organogénesis indirecta.

Yaicili & Alikamanoglu (2005, págs. 109-114), obtuvieron nuevos brotes para la multiplicación *in vitro* de *P. elongata* a partir de nudos con yemas axilares, partiendo de plántulas con tres meses de edad, disectando los nudos y colocándolos en medio M&S adicionado con 1 mg/L de BA y 0,1 mg/L de ANA, durante 25 días, misma vía utilizada por Song, Sato, Ishii, Saito, & Ohba (1990, págs. 495-498), en *P. catalpifolia* y; en *P. fortunei* por Sharma, Charan, & Dihman (2003, págs. 276-280), la última especie mencionada puede producir nuevos brotes en tan solo 25 a 30 días, como lo manifestado por los autores y lo obtenido en el presente estudio. Otra forma de producir plantas *in vitro* a gran escala es a través del uso de yemas apicales para la proliferación de yemas axilares en sistemas de micropropagación clonal, método que se ha comprobado en *P. fortunei* (Venkateswarlu, Mukhopadhyay, Sreenivason, & Kumar, 2001, págs. 594-599).

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican claramente que el empleo de los reguladores de crecimiento especialmente el BAP (citoquinina) en bajas concentraciones, son necesarios para la proliferación y elongación de brotes, es ampliamente conocido que una pequeña cantidad de citoquinina puede ser sintetizada por los brotes en crecimiento y que esta 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 citoquinina (Pérez J. , 1998, págs. 391-393).

Tabla 26:

Promedios y pruebas de significación para la variable número de nudos a los 10, 20 y 30 días para la evaluación de la multiplicación *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) bajo el sistema convencional.

Factores	Código	Número de nudos		
		10 días	20 días	30 días
ESPECIES (E)	e1 (<i>Paulownia elongata</i>)	9,20 ± 0,17 a	20,10 ± 0,17 a	28,85 ± 0,17 b
	e2 (<i>Paulownia fortunei</i>)	7,00 ± 0,17 c	13,45 ± 0,17 c	24,35 ± 0,17 c
	e3 (<i>Paulownia</i> híbrida)	7,60 ± 0,17 b	19,05 ± 0,17 b	31,10 ± 0,17 a
MEDIO DE CULTIVO (M)	m1 (M&S+ 4 mg/L BAP + 0,2 mg/L ANA)	7,87 ± 0,19 b	19,80 ± 0,20 b	28,20 ± 0,19 b
	m2 (M&S+ 2 mg/L BAP+ 0,05 mg/L ANA)	7,20 ± 0,19 bc	15,53 ± 0,20 c	27,53 ± 0,19 b
	m3 (M&S+ 0,2 mg/L BAP)	9,93 ± 0,19 a	21,60 ± 0,20 a	33,80 ± 0,19 a
	m4 (M&S+ 0,1 mg/L ANA+ 1 mg/L BAP)	6,73 ± 0,19 c	13,20 ± 0,20 d	22,87 ± 0,19 c
E x M	e1m1	8,80 ± 0,33 bc	21,20 ± 0,34 c	32,80 ± 0,34 b
	e1m2	8,80 ± 0,33 bc	18,80 ± 0,34 d	28,60 ± 0,34 d
	e1m3	11,60 ± 0,33 a	23,00 ± 0,34 b	35,00 ± 0,34 a
	e1m4	7,60 ± 0,33 cd	17,40 ± 0,34 de	19,00 ± 0,34 g
	e2m1	8,40 ± 0,33 bc	15,20 ± 0,34 f	20,80 ± 0,34 f
	e2m2	4,40 ± 0,33 e	10,80 ± 0,34 g	20,80 ± 0,34 f
	e2m3	9,00 ± 0,33 bc	16,80 ± 0,34 ef	31,00 ± 0,34 c
	e2m4	6,20 ± 0,33 d	11,00 ± 0,34 g	24,80 ± 0,34 e
	e3m1	6,40 ± 0,33 d	23,00 ± 0,34 b	31,00 ± 0,34 c
	e3m2	8,40 ± 0,33 bc	17,00 ± 0,34 e	33,20 ± 0,34 b
	e3m3	9,20 ± 0,33 b	25,00 ± 0,34 a	35,40 ± 0,34 a
	e3m4	6,40 ± 0,33 d	11,20 ± 0,34 g	24,80 ± 0,34 e

Tukey 5%

DMS 5%

Nota: A. Cárdenas, 2014

3.3.1.3 Índice de multiplicación

Para la variable índice de multiplicación la tabla 27, muestra los índices más altos obtenidos a los 30 días de evaluación en *m3* (M&S+ 0,2 mg/L BAP), para *P. elongata*; *P. fortunei* y *P. híbrida*, con 17,5; 15,5; y 17,7 respectivamente (anexo 10).

Clapa, Fira, Manuela, Vasu, & Buduroi (2014, págs. 6-14), dieron a conocer que utilizando un medio modificado Murashige & Skoog (M&S) complementado con 0,5 mg / L de BAP (6-Bencilaminopurina) y mT (meta-topolina) a las concentraciones de 0,5, 0,7 y 1 mg/L se puede lograr un alto índice de multiplicación para *P. elongata* y *P. fortunei*; logrando obtener para *P. fortunei* suplementado con 1 mg/L (mT) tasas de multiplicación promedios de 12,92. En esta investigación utilizando el *m3* (M&S completo + 0,2 mg/L BAP), se logró superar el índice de multiplicación, obteniendo para *P. fortunei* 15,50. En los medios *m1* (M&S completo +4 mg/L BAP + 0,2 mg/L ANA), *m2* (M&S completo + 2 mg/L BAP + 0,05 mg/L ANA), y *m4* (M&S completo + 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L ANA), debido a las altas concentraciones de reguladores de crecimiento se obtuvo una baja tasa brotes, y se observó la formación de callos en la base de cada explante; esto se corrobora en el estudio realizado por Clapa, Fira, Manuela, Vasu, & Buduroi (2014, págs. 6-14), quienes obtuvieron callo en la base de las plántulas, pero en menor proporción en las plántulas cultivadas en medios de cultivo con BAP y, lograron obtener un número promedio de 33,25 brotes/recipiente de cultivo, en M&S con 1 mg/L mT.

En el presente estudio se obtuvo un índice de multiplicación de 17,7 para *P. híbrido* (*P. fortunei* x *P. elongata*) siendo mucho más alto que el obtenido por Clapa et al. (2014, págs. 6-14), quienes obtuvieron una tasa de proliferación de 5,85 en los medios suplementados con 1 mg/L mT, demostrando que para dicha especie el BAP genera una mayor proliferación de brotes que mT (Meta-topolina). De igual manera para *P. elongata* se obtuvo una tasa de multiplicación de 17,5 siendo más alto que el obtenido por Clapa, Fira, Manuela, Vasu, & Buduroi (2014, págs. 6-14), quienes obtuvieron una tasa media de 9,4 en los medios suplementados con 1 mg/L mT.

La adición de mayores concentraciones de BAP se traduce en aumento de brotes, lo que se nota en el incremento de éstos como sucede en otras especies, por ejemplo los resultados reportados para *Manihot esculenta* (Guohua, 1998, págs. 1-7). A un nivel

celular, las citoquininas también parecen poseer un efecto directo sobre los niveles de DNA celular y sobre la síntesis de proteínas. Un efecto que produce las citoquininas es sobre la dominancia apical, aunque este es muy complejo y parece depender de un balance entre citoquininas, giberelinas y auxinas, es importante que exista un equilibrio auxina/citoquinina, pues la auxina induce diferenciación de la raíz y la citoquinina diferenciación del tallo. En un estudio de la iniciación de brotes adventicios en cotiledones de *Pseudotsuga menziesii* se necesitó la citoquinina (BAP 5 mM), para inducir la formación de yemas adventicias, pero resultaron 3 patrones de respuesta, dependiendo del nivel de auxina, con baja proporción solo se desarrollaron brotes, con cantidades mayores de auxina los cotiledones produjeron callo y muchos brotes, cuando se añadió solo auxina (NAA 5 mM) solo se formó callo (Ascon & Talon, 1993, págs. 37-67). Las diferentes plantas pueden responder en un modo distinto a las diversas citoquininas y auxinas externas, debido a su control hormonal natural. Una secuencia apropiada de hormonas es de importancia particular, en cuanto que una hormona puede tener un efecto inductor, pero debe estar ausente o en cantidad reducida para que crezca el órgano (Ascon & Talon, 1993, págs. 67-68).

Tabla 27:

Índice de multiplicación para la fase II para *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) bajo el sistema convencional.

Tratamientos	Especie	Medio de cultivo	Índice de multiplicación
T1	<i>P. elongata</i>	M1	16,4
T2	<i>P. elongata</i>	M2	14,3
T3	<i>P. elongata</i>	M3	17,5
T4	<i>P. elongata</i>	M4	9,5
T5	<i>P. fortunei</i>	M1	10,4
T6	<i>P. fortunei</i>	M2	10,4
T7	<i>P. fortunei</i>	M3	15,5
T8	<i>P. fortunei</i>	M4	12,4
T9	<i>P. híbrida</i>	M1	15,5
T10	<i>P. híbrida</i>	M2	16,6
T11	<i>P. híbrida</i>	M3	17,7
T12	<i>P. híbrida</i>	M4	12,4

Descripción del medio de cultivo:
m1= MS+ 4 mg/L BAP + 0,2 mg/L ANA. **m2=** MS+ 2 mg/L BAP + 0,05 mg/L ANA.
m3= MS+ 0,2 mg/L BAP. **m4=** MS+ 1 mg/L BAP.+ 0,1 mg/L ANA.

Nota: A. Cárdenas, 2014

3.3.1.4 Tasa de pérdida

Se obtuvo un 0% de tasa de pérdida ya que no hubo mortalidad en ningún tratamiento.

3.3.2 Sistema de Inmersión Temporal

3.3.2.1 Brotación de explantes (%)

Porcentaje de brotación a los 15 días

Para esta variable, la tabla 28, muestra que el mayor porcentaje de brotación (100%), corresponde a los tratamientos T1 (e1f1), T2 (e1f2), T3 (e2f1), T4 (e2f2), y T5 (e3f1) y el menor porcentaje (0%) corresponde al tratamiento T6 (e3f2).

Porcentaje de brotación a los 30 días

Para esta variable la tabla 28, muestra el 100% de brotación para los tratamientos T1 (e1f1), T2 (e1f2), T3 (e2f1), T4 (e2f2), T5 (e3f1) y T6 (e3f2) debido a que se incrementó la tasa de crecimiento (Anexo 11).

Estos resultados posiblemente se deben a que existió un óptimo contacto entre el medio líquido y la biomasa vegetal, mejor intercambio gaseoso y buen balance nutricional, que se expresa en cantidad y calidad de los brotes (Berthouly, Dufour, Alvard, Carasco, Alemano, & Teisson, 1995, págs. 514-519). Los brotes competentes generados en este trabajo, son el resultado de crear las condiciones necesarias, se evitaron factores descritos que generan la hiperhidratación y por consiguiente la reducción de la calidad y cantidad de los brotes. En consecuencia, es posible que los valores de porcentaje de brotes competentes conseguidos en esta investigación aún no sean recomendables y que variando la frecuencia y el tiempo de inmersión sea posible lograr porcentajes de brotes competentes más elevados, inclusive modificando el medio de cultivo.

La utilización de sistemas de inmersión temporal en el cultivo de varias especies, como es *E. globulus* origina altas tasas de proliferación de brotes como las obtenidas por González, Ríos, Avilés, & Sánchez (2011, págs. 147-154); de $37,8 \pm 7,9$; McAlister, Finnie, Watt, & Blakeway (2005, págs. 347-358), obtuvieron más del

doble de generación de brotes con respecto al medio semisólido en diferentes clones de *Eucalyptus* spp.

Según Preil (2005, págs. 1-20), el aumento de la brotación se puede deber principalmente a que la absorción de nutrientes y reguladores del crecimiento es por toda la superficie del tejido, lo que puede maximizar el desarrollo del explante. Por otro lado, Bouman & Tiekstra (2005, págs. 493-508), postulan que los precipitados se redisuelven en el medio líquido, debido a una disminución en el pH o por la absorción de la planta de componentes disueltos en el medio y el cambio resultante en el equilibrio de disociación, lo que provoca la solubilización de los precipitados, a diferencia de los medios con agar donde sólo una parte pequeña del medio presenta estos cambios, por lo cual existe una acumulación de precipitados.

Trabajos realizados para la multiplicación *in vitro* de *Musa* spp., mediante el sistema de inmersión temporal, demostraron que el tratamiento de inmersión de 1 minuto produce mejores resultados; en tratamientos de 1, 12 y 24 horas el desarrollo fue de un 60% menor, afirmando que el tiempo de inmersión afecta la tasa de respiración del tejido, ya que la actividad superóxido dismutasa y la peroxidación de lípidos aumenta con la duración de la inmersión, de tal manera parece que el período de inmersión induce un sustancial estrés oxidativo (Colmenares & Giménez, 2003, págs. 468-477).

González (2003, págs. 37-39), obtuvo un porcentaje de brotación en microestacas de vainilla de un 75% a 90 % a la cuarta semana de sembrado los explantes, mientras que en los tratamientos de ápice de tallo el mayor porcentaje fue de un 45% y el menor de un 5%, mientras que las yemas axilares de las microestacas se desarrollaron más rápido que en los ápices de tallo, debido a la eliminación de la dominancia apical mediante el corte para extraer el explante además, la adición al medio de cultivo de BA. En el presente estudio se obtuvieron similares resultados para las tres especies del género *Paulownia* por lo que la eliminación de la parte apical y la base de los explantes al momento de la siembra es importante para poder obtener un mayor número de explantes vivos.

Tabla 28:

Rangos, frecuencias y porcentajes de la variable brotación a los 15 y 30 días de evaluación en la fase II de multiplicación *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) bajo el Sistema de Inmersión Temporal.

Tratamientos	Codificación	Porcentaje (%)	
		15 días	30 días
T1	e ₁ f ₁	100	100
T2	e ₁ f ₂	100	100
T3	e ₂ f ₁	100	100
T4	e ₂ f ₂	100	100
T5	e ₃ f ₁	100	100
T6	e ₃ f ₂	0	100

Descripción de la codificación:

e₁= *Paulownia elongata*

e₂= *Paulownia fortunei*

e₃= *Paulownia* híbrida

f₁= cada tres horas durante un minuto

f₂= cada seis horas durante un minuto

Nota: A. Cárdenas, 2014

3.3.2.2 Longitud de brote

En el análisis de varianza para esta variable (tabla 29), se muestra alta significación estadística, para frecuencias, especies y su interacción (<0,0001). El promedio de longitud de brote fue 1,00 cm y el coeficiente de variación de 2,17%, que para este tipo de experimento es considerado óptimo.

Tabla 29:

ADEVA para la longitud de brote de evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) bajo el sistema de inmersión temporal.

F de V	30 días		
	(GL)	Cuadrados medios	p-valor
TOTAL	17		
TRATAMIENTOS	5	0,35	<0,0001
Especies (E)	2	0,66	<0,0001
Frecuencia (F)	1	0,34	<0,0001
E x F	2	0,05	<0,0001
ERROR EXPERIMENTAL	12	4,7E ⁻⁴	
Promedio	1,00		
CV	2,17%		

Nota: A. Cárdenas, 2014

Longitud de brote a los 30 días para Especies

Tukey al 5% a los 30 días para especies (tabla 30), identificó tres rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *e2* (*Paulownia fortunei*), con un promedio de $1,38 \pm 0,01$ cm; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *e1* (*Paulownia elongata*), con un promedio de $0,86 \pm 0,01$ cm y finalmente en el tercer rango se ubicó *e3* (*P. híbrida*) con un promedio de $0,76 \pm 0,01$ cm.

Longitud de brote a los 30 días para Frecuencias

Tukey al 5% a los 30 días para medios de cultivo (tabla 30), detectó dos rangos de significancia. En el primer rango se ubicó *f1* (cada tres horas y un minuto de inmersión), con un promedio de $1,14 \pm 0,01$ cm; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *f2* (cada seis horas y un minuto de inmersión), con un promedio de $0,86 \pm 0,01$ cm.

Longitud de brote a los 30 días para la interacción entre Especies x Frecuencias.

Tukey al 5% a los 30 días para la interacción Especies por frecuencias (tabla 30), identificó seis rangos de significancia. En el primer rango se ubicó a *P. fortunei* con la *f1* (cada tres horas y un minuto de inmersión), con un promedio de $1,61 \pm 0,01$ cm, luego se ubicó a *P. elongata* con la *f1* (cada tres horas y un minuto de inmersión), con un promedio de $0,94 \pm 0,01$ cm y finalmente se ubicó a *P. híbrido* con la *f1* (cada tres horas y un minuto de inmersión), con un promedio de $0,85 \pm 0,01$ cm (anexo 12).

Durante 4 semanas se observó el crecimiento y desarrollo de brotes de *Paulownia* en los explantes utilizados. La brotación inicio en las microestacas a partir de la segunda semana después de la siembra, lo que concuerda con Alatorre (2002, págs. 86-88), el primero obtuvo brotes vegetativos en vainilla a partir de microestacas a las cuatro semanas de siembra, mientras el último logró brotación múltiple en vainilla entre los 21 y 28 días de cultivo a partir de yemas axilares.

Estudios realizados por Jiménez (2005, págs. 64-65), al evaluar la respuesta de la longitud promedio de brotes de piña de la variedad MD-2, utilizando dos sistemas de propagación *in vitro*, medio semisólido y líquido, en Sistema de Inmersión Temporal; obtuvo después de 8 semanas de inoculados los explantes iniciales,

longitudes promedios de 3.3 cm por brote en medio líquido en Sistema de Inmersión Temporal y en medio semisólido obtuvo 1.1 cm por brote, obteniendo resultado óptimos usando los SIT.

Escalona y otros (1999, págs. 743-748), manifiesta que los sistemas líquidos, desarrollan plantas competentes para su posterior aclimatación *ex vitro*; ya que estas experimentan un mayor desarrollo foliar, comparado con el medio sólido, y un gran número de explantes en cortos períodos de tiempo.

Tabla 30

Promedios y pruebas de significación para la variable longitud de brote para la evaluación a los 30 días de multiplicación de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) bajo el sistema de inmersión temporal.

Factores	Código	Longitud de brote (cm)
		30 días
ESPECIES (E)	e1 (<i>Paulownia elongata</i>)	0,86 ± 0,01 b
	e2 (<i>Paulownia fortunei</i>)	1,38 ± 0,01 a
	e3 (<i>Paulownia</i> híbrida)	0,76 ± 0,01 c
FRECUENCIAS (F)	f1 (cada tres horas y un minuto de inmersión)	1,14 ± 0,01 a
	f2 (cada seis horas y un minuto de inmersión)	0,86 ± 0,01 b
E x F	e1f1	0,94 ± 0,01 c
	e1f2	0,78 ± 0,01 e
	e2f1	1,61 ± 0,01 a
	e2f2	1,14 ± 0,01 b
	e3f1	0,85 ± 0,01 d
	e3f2	0,67 ± 0,01 f

Tukey 5%

DMS 5%

Nota: A. Cárdenas, 2014

3.3.2.3 *Porcentaje de brotes hiperhidratados*

Esta variable evaluada a los 30 días, mostró un 0% de explantes hiperhidratados, en todos los tratamientos, similar a los datos obtenidos en la investigación reportada por Becerra, Paredes, Luengo, & Rodón (2012, págs. 45-60), en la que obtienen una metodología por medio del SIT para el trabajo con *Paulownia* donde manifestaron la obtención de un porcentaje menor al 1% de hiperhidricidad. En la presente investigación, el tiempo de exposición de un minuto y la frecuencia de cada tres horas redujeron la expresión de la hiperhidratación.

En la atmósfera interna del frasco podemos encontrar elementos tales como CO₂, O₂, N₂, etileno, etanol y acetaldehído, y vapor de agua producto de la respiración y fotosíntesis del material vegetal y, la concentración de estos elementos pueden llegar a niveles tóxicos pudiendo afectar el crecimiento, desarrollo y calidad del material vegetal *in vitro*. El intercambio gaseoso que ocurre principalmente durante cada inmersión, renueva completamente la atmósfera interna del biorreactor (Kozai & Smith, 1995, págs. 301-318).

Las condiciones óptimas de inmersión dependen de la especie, pues en el caso de café (*Coffea canefora*) cuando se emplearon cuatro inmersiones al día de 15 min cada una, las cuales se aplicaron con éxito a *C. arabica*, hubo un alto porcentaje de hiperhidricidad, el cual se redujo cuando se cambió a dos inmersiones de 1 min por día. Mismo tiempo de inmersión que el recomendado en el presente estudio. La frecuencia y duración de la inmersión tuvo un efecto directo en el desarrollo de embriones de *Coffea* sp. (Teisson & Alvard, 1995, págs. 105-110). En la presente investigación se logró obtener 0% de hiperhidratación posiblemente por la frecuencia y tiempo de inmersión que fueron relativamente cortos.

Etienne & Berthouly (2005, págs. 215-231), mencionan que para evitar la vitrificación de varias especies deben usarse tiempos cortos y frecuencias espaciadas de inmersión, ya que el contacto continuo de los tejidos con el medio de cultivo es fuente de hiperhidratación, por este motivo es importante determinar el tiempo y frecuencia dependiendo la especie, porque en especies forestales como es *Paulownia* utilizando frecuencias cortas de 3 - 6 horas y un tiempo de inmersión de un minuto, no se produjo hiperhidratación, además por otro lado en los sistemas de inmersión

temporal los explantes están en contacto intermitente con el medio de cultivo y esto causa una estimulación de la absorción de nutrientes por parte de los explantes, además los explantes están cubiertos la mayoría del tiempo por una fina capa de medio de cultivo que impide la desecación y por ende, la resistencia a la difusión de gases entre la atmosfera y el explante es menor, en consecuencia hay un mayor desarrollo de los explantes.

3.3.2.4 Índice de multiplicación

Para esta variable la tabla 31, muestra los índices de multiplicación obtenidos a los 30 días de evaluación; el índice más alto, se presentó con la frecuencia *fl* para *P. elongata*, *P. fortunei* y *P. híbrida* con 4,18; 4,35 y 3,42 respectivamente (anexo 13).

Perrugoría (2012, págs. 1-2), afirma que la multiplicación de plantas en medios de cultivo líquido por medio de biorreactores, representa una posibilidad de generar un mayor número de plantas en menos tiempo y con costos inferiores en comparación al sistema de producción en medio semisólido; sin embargo, este sistema presenta problemas a superar como son la contaminación por hongos y bacterias, y la deformación de los tejidos causada por la hiperhidricidad o vitrificación, que sufren los explantos sumergidos en el medio de cultivo, afectando la anatomía y fisiología de las plantas y por lo tanto, su sobrevivencia. En la presente investigación se utilizó la frecuencia *fl* (cada tres horas con un tiempo de inmersión de minuto) probada por Perrugoría (2012, págs. 1-2), para dos especies leñosas, *Eucalyptus grandis* y el portainjerto M9 de *Malus domestica*, con el objetivo de ajustar la tecnología de los biorreactores de inmersión temporal RITA® y de inmersión permanente en estas especies, en la presente investigación el *fl* resultó ser la frecuencia óptima para este tipo de especies, estos resultados posiblemente se deben al tiempo corto de exposición y la frecuencia espaciada (8 inmersiones/día), debido a que mejora las condiciones del ambiente interno del frasco evitando, a su vez, el contacto continuo de los tejidos con el medio de cultivo.

El tiempo de inmersión es considerado un factor importante en la respuesta morfogénica del material vegetal a micropropagar. Al respecto, Escalona (1999, págs. 743-748), para el cultivo de la piña (*Ananas comosus* (L) Merr.), encontró que con un tiempo de inmersión de dos minutos/hora con una frecuencia de tres horas se

logró los mayores incrementos en el coeficiente de multiplicación y por lo tanto se facilitó una mayor eficiencia en la asimilación de nutrientes por los explantes.

La duración del tiempo de inmersión se ha modificado en diferentes ocasiones en dependencia de la especie, cultivar y método de propagación que se emplee y ha sido de gran importancia dentro de las distintas especies (Escalona, y otros, 1999, págs. 743-748).

Dottin (2000, págs. 3-4), utilizó un tiempo de inmersión de siete minutos y obtuvo un elevado coeficiente de multiplicación (13,80) en el cultivo de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott), con respecto al clon de Malanga INIVITMC-2001, obtuvo un índice de 10,45 en sistemas de inmersión temporal. Determinar el tiempo de inmersión en la multiplicación en SIT, es muy importante, ya que este determina la absorción de nutrientes por los brotes (Berthouly, Dufour, Alvard, Carasco, Alemano, & Teisson, 1995, págs. 514-519).

La frecuencia y el tiempo de inmersión constituyen factores importantes en la respuesta morfogénica de las diferentes especies de plantas. En la multiplicación axilar de brotes de piña, se lograron coeficientes de multiplicación de 12,0 en seis semanas con el empleo de un tiempo y frecuencia de inmersión de dos minutos cada tres horas (Escalona, y otros, 1999, págs. 743-748). Colmenares & Giménez (2003, págs. 468-477), trabajaron en el banano ‘Gran Enano’ (AAA) con inmersiones de dos minutos cada cuatro horas, obtuvieron un coeficiente de multiplicación de 7,5 y para veinte minutos cada cuatro horas obtuvieron un índice de multiplicación de 8,0 en frascos de 10,0 L. Cabrera, y otros (2005, págs. 103-107), emplearon un tiempo de inmersión de diez minutos y una frecuencia de 6 horas y obtuvieron 4,7 microtubérculos de ñame en SIT en el clon Pacala Duclos (*Dioscorea alata* (L) Point), en frascos de inmersión temporal de cinco litros. Castro, Díaz, & Montoya (2001, págs. 3-7), señalaron que durante la fase de multiplicación de brotes de *Eucaliptus grandis*, al emplear una frecuencia de 24 horas con una duración de tres minutos el número de brotes por explantes fue significativamente superior al obtenido con un minuto de inmersión, sin embargo, en ambos se observó la presencia de brotes hiperhidratados. Los efectos del tiempo de inmersión en la respuesta morfogénica de los tejidos deben estar relacionados con las relaciones hídricas y el

intercambio gaseoso que se logra en esta formación de cultivo según (Escalona, y otros, 1999, págs. 743-748). Dottin (2000, págs. 1-9), en el cultivo de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott) al utilizar una frecuencia de cuatro horas, obtuvo un coeficiente de multiplicación (14,50) con el empleo del sistema de inmersión temporal.

Tabla 31:

Índice de multiplicación para la fase II para *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) bajo el Sistema de Inmersión Temporal.

Tratamientos	Especie	Frecuencia	Índice de multiplicación
T1	e1	f1	4,18
T2	e1	f2	3,52
T3	e2	f1	4,35
T4	e2	f2	4,30
T5	e3	f1	3,42
T6	e3	f2	3,15

Descripción de la codificación:

e1= *Paulownia elongata*

e2= *Paulownia fortunei*

e3= *Paulownia* híbrida

f1= cada tres horas durante un minuto

f2= cada seis horas durante un minuto

Nota: A. Cárdenas, 2014

3.4 Fase III: Enraizamiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*), en medio sólido de explantes provenientes del sistema convencional

3.4.1 Número de raíces

En el análisis de la varianza para esta variable (tabla 32) se detectó significación estadística para medios de cultivo, especies y su interacción M x E (<0,0001). El promedio de raíces a los 15 y 30 días fue 5,29 y 5,69; el coeficiente de variación fue de 10,96% y 13,39% respectivamente, considerado óptimo para este tipo de experimentos.

Tabla 32:

ADEVA para la variable número de raíces evaluada para el enraizamiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).

F de V	15 días			30 días		
	(GL)	Cuadrados medios	p-valor	(GL)	Cuadrados medios	p-valor
TOTAL	89			89		
TRATAMIENTOS	8	46,16	<0,0001	8	40,79	<0,0001
Especies (E)	2	6,58	<0,0001	2	6,34	0,0001
Medios de Cultivo (M)	2	101,11	<0,0001	2	107,91	<0,0001
E x M	4	38,48	<0,0001	4	24,44	<0,0001
ERROR EXPERIMENTAL	81	0,34		81	0,58	
Promedio	5,29			5,69		
CV	10,96%			13,39%		

Nota: A. Cárdenas, 2014

Número de raíces a los 15 y 30 días para Especies

Tukey al 5% a los 15 días para especies (tabla 33), identificó tres rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *e2* (*Paulownia fortunei*) con un promedio de $5,73 \pm 0,11$; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *e3* (*Paulownia* híbrida) con un promedio de $5,33 \pm 0,11$ y finalmente en el tercer rango se ubicó *e1* (*Paulownia elongata*) con un promedio de $4,80 \pm 0,11$.

Tukey al 5% a los 30 días para especies (tabla 33), identificó dos rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *e2* (*Paulownia fortunei*) con un promedio de $6,03 \pm 0,14$; y luego se ubicó a *e3* (*Paulownia* híbrida) con un promedio de $5,87 \pm 0,14$ y finalmente *e1* (*Paulownia elongata*), con un promedio de $5,17 \pm 0,14$.

Número de raíces a los 15 y 30 días para Medios de cultivo

Tukey al 5% a los 15 días para medios de cultivo (tabla 33), detectó dos rangos de significancia. En el primer rango se ubicó *m2* (M&S con 0,4 mg/L IBA), con un promedio de $7,40 \pm 0,11$; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *m1* (M&S con 0,2 mg/L ANA y 0,4 mg/L IBA), con un promedio de $4,40 \pm 0,11$ y *m3* (M&S con 1,5 mg/L IBA), con un promedio de $4,07 \pm 0,11$.

Tukey al 5% a los 30 días para medios de cultivo (tabla 33), detectó dos rangos de significancia. En el primer rango se ubicó *m2* (M&S con 0,4 mg/L IBA), con un promedio de $7,87 \pm 0,14$, en el segundo rango se ubicó *m1* (M&S con 0,2 mg/L ANA y 0,4 mg/L IBA), con un promedio de $4,80 \pm 0,14$, y finalmente se ubicó *m3* (M&S con 1,5 mg/L IBA), con un promedio de $4,40 \pm 0,14$.

Número de raíces a los 15 y 30 días para la interacción entre Especies y Medios de cultivo

Tukey al 5% a los 15 días para la interacción Especies por Medios de cultivo (tabla 33), identificó cinco rangos de significancia, ubicando a *m2* como el medio de cultivo óptimo para *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido en el que se utilizó M&S suplementado con 0,4 mg/L de IBA. En el primer rango se ubicó a *P. híbrida*, con un promedio de $9,30 \pm 0,18$, luego se ubicó a *P. elongata*, con un promedio de $6,50 \pm 0,18$ y finalmente se ubicó a *P. fortunei*, con un promedio de $6,40 \pm 0,18$.

Tukey al 5% a los 30 días para la interacción Especies por Medios de cultivo (tabla 33), identificó cinco rangos de significancia, ubicando a *m2* como el medio de cultivo óptimo para *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido en el que se utilizó M&S suplementado con 0,4 mg/L de IBA. En el primer rango se ubicó a *P. híbrido*, con un promedio de $9,30 \pm 0,24$, luego se ubicó a *P. fortunei*, con un promedio de $7,40 \pm 0,24$ y finalmente se ubicó a *P. elongata*, con un promedio de $6,90 \pm 0,24$ (anexo 14).

Todos los tratamientos para enraizamiento utilizados en este ensayo permitieron la supervivencia de las plantas en condiciones de invernadero; comparado a lo enunciado por Castellanos, Rodríguez, Rodríguez, & Rodríguez (2006, págs. 1-12), quienes utilizaron 1,5 mg/L de IBA obteniendo un promedio de 35 raíces aproximadamente por planta, pero en el presente estudio se contabilizaron únicamente las raíces principales por lo que se obtuvo 7,40 raíces por planta, utilizando el mismo medio.

Se ha comprobado que brotes de *Paulownia* formaron raíces adventicias cuando se establecieron en medio de cultivo con bajas concentraciones de auxina (0,4 mg/L IBA), ya que se conoce que las auxinas son reguladores de crecimiento que inducen la formación de raíces adventicias, lo anterior sugiere que en los brotes ocurrió la

síntesis de esta sustancia. Pero los brotes que se establecieron en medios con las dosis menores de auxina formaron mayor cantidad de raíces y en menor tiempo, lo cual sugiere que la auxina exógena fue complementaria a la auxina endógena para estimular una respuesta de formación de raíces cercana al óptimo. Así también, las dosis mayores de auxina exógena superaron el nivel necesario para la respuesta óptima y causaron inhibición parcial, como lo sugieren (Etienne & Berthouly, 2005, págs. 215-231).

Tabla 33:

Promedios y pruebas de significación para la variable número de raíces a los 15 y 30 días para la evaluación del enraizamiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).

Factores	Código	Numero de raíces	
		15 días	30 días
ESPECIES (E)	e1 (<i>Paulownia elongata</i>)	4,80 ± 0,11 c	5,17 ± 0,14 b
	e2 (<i>Paulownia fortunei</i>)	5,73 ± 0,11 a	6,03 ± 0,14 a
	e3 (<i>Paulownia</i> híbrida)	5,33 ± 0,11 b	5,87 ± 0,14 a
MEDIO DE CULTIVO (M)	m1 (M&S+ 0,2 mg/L ANA + 0,4 mg/L IBA)	4,40 ± 0,11 b	4,80 ± 0,14 b
	m2 (M&S+ 0,4 mg/L IBA)	7,40 ± 0,11 a	7,87 ± 0,14 a
	m3 (M&S+ 1,5 mg/L IBA)	4,07 ± 0,11 b	4,40 ± 0,14 b
E x M	e1m1	5,50 ± 0,18 c	5,90 ± 0,24 cd
	e1m2	6,50 ± 0,18 b	6,90 ± 0,24 bc
	e1m3	2,40 ± 0,18 e	2,70 ± 0,24 e
	e2m1	5,40 ± 0,18 c	5,10 ± 0,24 d
	e2m2	6,40 ± 0,18 b	7,40 ± 0,24 b
	e2m3	5,40 ± 0,18 c	5,60 ± 0,24 d
	e3m1	2,30 ± 0,18 e	3,40 ± 0,24 e
	e3m2	9,30 ± 0,18 a	9,30 ± 0,24 a
e3m3	4,40 ± 0,18 d	4,90 ± 0,24 d	

Tukey 5%

DMS 5%

Nota: A. Cárdenas, 2014

3.4.2 Longitud de la raíces

En el análisis de la varianza para esta variable la tabla 34 se detectó significación estadística para medios de cultivo, especies y la interacción (E x M). El promedio de la variable longitud de raíces a las 15 y 30 días fue 1,28 y 3,90 respectivamente; el coeficiente de variación fue de 20,49% y 12,88% respectivamente, considerado óptimo para este tipo de experimentos.

Tabla 34:

ADEVA para la variable longitud de raíces evaluada a los 15 y 30 días para el enraizamiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).

F de V	15 días			30 días		
	(GL)	Cuadrados medios	p-valor	(GL)	Cuadrados medios	p-valor
TOTAL	89			89		
TRATAMIENTOS	8	4,44	<0,0001	8	29,69	<0,0001
Especies (E)	2	15,28	<0,0001	2	72,26	<0,0001
Medios de Cultivo (M)	2	1,49	<0,0001	2	39,88	<0,0001
E x M	4	0,50	0,0001	4	3,32	<0,0001
ERROR EXPERIMENTAL	81	0,07		81	0,25	
Promedio CV		1,28 20,49%			3,90 12,88%	

Nota: A. Cárdenas, 2014

Longitud de raíces a los 15 y 30 días para Especies

Tukey al 5% a los 15 días para especies (tabla 35), identificó tres rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *e1* (*Paulownia elongata*) con un promedio de $2,06 \pm 0,05$ cm; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *e2* (*Paulownia fortunei*), con un promedio de $1,12 \pm 0,05$ cm y finalmente en el tercer rango se ubicó *e3* (*Paulownia* híbrida) con un promedio de $0,66 \pm 0,05$ cm.

Tukey al 5% a los 30 días para especies (tabla 35), identificó tres rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *e1* (*Paulownia elongata*) con un promedio de $5,59 \pm 0,09$ cm; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *e2* (*Paulownia fortunei*), con un promedio de $3,58 \pm 0,09$ cm

y finalmente en el tercer rango se ubicó *e3* (*Paulownia* híbrida) con un promedio de $2,54 \pm 0,09$ cm.

Longitud de raíces a los 15 y 30 días para Medios de cultivo

Tukey al 5% a los 15 días para medios de cultivo (tabla 35), detectó tres rangos de significancia. En el primer rango se ubicó *m2* (M&S con 0,4 mg/L IBA), con un promedio de $1,52 \pm 0,05$ cm; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *m3* (M&S con 1,5 mg/L IBA), con un promedio de $1,25 \pm 0,05$ cm y *m1* (M&S con 0,2 mg/L ANA y 0,4 mg/L IBA), con un promedio de $1,08 \pm 0,05$ cm.

Tukey al 5% a los 30 días para medios de cultivo (tabla 35), detectó tres rangos de significancia. En el primer rango se ubicó *m2* (M&S con 0,4 mg/L IBA), con un promedio de $5,22 \pm 0,09$ cm; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *m3* (M&S con 1,5 mg/L IBA), con un promedio de $3,45 \pm 0,09$ cm y *m1* (M&S con 0,2 mg/L ANA y 0,4 mg/L IBA), con un promedio de $3,05 \pm 0,09$ cm.

Longitud de raíces a los 15 y 30 días para la interacción entre Especies y Medios de cultivo

Tukey al 5% a los 15 días para la interacción Especies por Medios de cultivo (tabla 35), identificó cuatro rangos de significancia, ubicando a *m2* como el medio de cultivo óptimo para *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrida, en el que se utilizó M&S suplementado con 0,4 mg/L de IBA. En el primer rango se ubicó a *P. elongata*, con un promedio de $2,39 \pm 0,08$ cm, luego se ubicó a *P. fortunei*, con un promedio de $1,39 \pm 0,08$ cm y finalmente se ubicó a *P. híbrida*, con un promedio de $0,78 \pm 0,08$ cm.

Tukey al 5% a los 30 días para la interacción Especies por Medios de cultivo (tabla 35), identificó cinco rangos de significancia, ubicando a *m2* como el medio de cultivo óptimo para *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido en el que se utilizó M&S suplementado con 0,4 mg/L de IBA (Anexo 15). En el primer rango se ubicó a *P. elongata*, con un promedio de $7,03 \pm 0,16$ cm, luego se ubicó a *P. fortunei*, con un promedio de $5,40 \pm 0,16$ cm y finalmente se ubicó a *P. híbrida*, con un promedio de $3,22 \pm 0,16$ cm. Resultados similares se encontraron en *P. elongata*, utilizando segmentos foliares de plántulas establecidas *in vitro*, los brotes se transfirieron a un

medio diluido al 50% de M&S con IBA para promover formación de raíces cuando alcanzaron una longitud de 3 cm o más y finalmente se adaptaron en invernadero (Bergmann & Moon, 1997, págs. 315-317).

Algunos de los factores que pueden ser determinantes en el éxito del enraizamiento de los explantes, son el tipo y cantidad de auxinas aplicadas para favorecer la formación de raíces adventicias porque modifican la extensibilidad celular, al producir factores que ablandan la pared. El ácido indolbutírico (IBA) es un fitorregulador auxínico sintético comúnmente utilizado por su estabilidad, ya que es muy resistente a la oxidación por la luz, enzimas u otros agentes (Ramos, 2012, págs. 55-56).

Por los antecedentes anotados, se puede señalar que la concentración de IBA 0,4 mg/L ensayada dió resultados satisfactorios, así mismo, se puede manifestar que es necesario el uso de auxinas en el enraizamiento de explantes de especies forestales, confirmando de esta manera lo manifestado por (Castillo A. , 2004, págs. 1-2), quien afirma que para enraizar los explantes se requiere un medio que contenga auxinas.

Las auxinas son consideradas los principales agentes de desdiferenciación tisular, que a menudo resulta en la formación de callos (Kembo & Hornung, 1999, págs. 1-2). El ácido indolbutírico (IBA) es la auxina normalmente utilizada para el enraizamiento, ya que es un inductor y diferenciador de raíz, y el ácido naftalenacético (ANA) es un inductor que promueve la organogénesis, principalmente la generación de callo como parte del rejuvenecimiento o en respuesta a heridas por corte y manipulación (Chinchilla, 2008, págs. 34-38). En el presente estudio el medio *m1* (M&S + 0,2 mg/L ANA + 0,4 mg/L IBA), estaba conformado por ANA e IBA, la combinación de dichas auxinas no dieron resultados óptimos ($3,05 \pm 0,09$ cm), por lo que para las tres especies del género *Paulownia* posiblemente esta relación de concentraciones de auxinas no son las recomendadas.

Tabla 35:

Promedios y pruebas de significación para la longitud de raíces (cm) a los 15 y 30 días para la evaluación del enraizamiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).

Factores	Código	Longitud de raíces (cm)	
		15 días	30 días
ESPECIES (E)	e1 (<i>Paulownia elongata</i>)	2,06 ± 0,05 a	5,59 ± 0,09 a
	e2 (<i>Paulownia fortunei</i>)	1,12 ± 0,05 b	3,58 ± 0,09 b
	e3 (<i>Paulownia</i> híbrida)	0,66 ± 0,05 c	2,54 ± 0,09 c
MEDIO DE CULTIVO (M)	m1 (M&S + 0,2 mg/L ANA + 0,4 mg/L IBA)	1,08 ± 0,05 c	3,05 ± 0,09 c
	m2 (M&S + 0,4 mg/L IBA)	1,52 ± 0,05 a	5,22 ± 0,09 a
	m3 (M&S + 1,5 mg/L IBA)	1,25 ± 0,05 b	3,45 ± 0,09 b
E x M	e1m1	1,70 ± 0,08 b	4,35 ± 0,16 c
	e1m2	2,39 ± 0,08 a	7,03 ± 0,16 a
	e1m3	2,10 ± 0,08 a	5,40 ± 0,16 b
	e2m1	0,78 ± 0,08 d	2,60 ± 0,16 de
	e2m2	1,39 ± 0,08 bc	5,40 ± 0,16 b
	e2m3	1,20 ± 0,08 c	2,75 ± 0,16 de
	e3m1	0,75 ± 0,08 d	2,20 ± 0,16 e
	e3m2	0,78 ± 0,08 d	3,22 ± 0,16 d
e3m3	0,46 ± 0,08 d	2,20 ± 0,16 e	

Tukey 5%
DMS 5%

Nota: A. Cárdenas, 2014

3.4.3 Longitud de la plántula (cm)

En el análisis de la varianza para esta variable (tabla 36) se detectó significación estadística para medios de cultivo, especies y la interacción M x E. El promedio de la variable longitud de planta a los 15 y 30 días fue 1,70 cm y 3,63 cm respectivamente. El coeficiente de variación fue de 19,92% y 10,99% respectivamente, considerado muy bueno para este tipo de experimentos.

Tabla 36:

ADEVA para la variable longitud la plántula evaluada para el enraizamiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).

F de V	15 días			30 días		
	(GL)	Cuadrados medios	p-valor	(GL)	Cuadrados medios	p-valor
TOTAL	89			89		
TRATAMIENTOS	8	2,44	<0,0001	8	7,72	<0,0001
Especies (E)	2	4,28	<0,0001	2	22,01	<0,0001
Medios de Cultivo (M)	2	4,74	<0,0001	2	7,31	<0,0001
E x M	4	0,36	0,0191	4	0,77	0,0014
ERROR EXPERIMENTAL	81	0,12		81	0,16	
Promedio		1,70			3,63	
CV		19,92%			10,99%	

Nota: A. Cárdenas, 2014

Longitud de la plántula a los 15 y 30 días para Especies

Tukey al 5% a los 15 días para especies (tabla 37), identificó dos rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *e1* (*Paulownia elongata*) con un promedio de $2,00 \pm 0,06$ cm; y se ubicó a *e2* (*Paulownia fortunei*), con un promedio de $1,83 \pm 0,06$ cm, en el segundo rango se ubicó *e3* (*Paulownia* híbrida) con un promedio de $1,28 \pm 0,06$ cm.

Tukey al 5% a los 30 días para especies (tabla 37), identificó tres rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *e1* (*Paulownia elongata*) con un promedio de $4,44 \pm 0,07$ cm; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *e2* (*Paulownia fortunei*), con un promedio de $3,71 \pm 0,07$ cm y finalmente en el tercer rango se ubicó *e3* (*Paulownia* híbrida) con un promedio de $2,73 \pm 0,07$ cm.

Longitud de la plántula a los 15 y 30 días para Medios de cultivo

Tukey al 5% a los 15 días para medios de cultivo (tabla 37), detectó tres rangos de significancia. En el primer rango se ubicó *m2* (M&S con 0,4 mg/L IBA), con un promedio de $2,15 \pm 0,06$ cm; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *m1* (M&S con 0,2 mg/L ANA y 0,4 mg/L IBA), con un promedio de $1,59 \pm 0,06$ cm y *m3* (M&S con 1,5 mg/L IBA), con un promedio de $1,38 \pm 0,06$ cm.

Tukey al 5% a los 30 días para medios de cultivo (tabla 37), detectó dos rangos de significancia. En el primer rango se ubicó *m2* (M&S con 0,4 mg/L IBA), con un promedio de $4,20 \pm 0,07$ cm; en tanto que, en el segundo rango se ubicó *m1* (M&S con 0,2 mg/L ANA y 0,4 mg/L IBA), con un promedio de $3,39 \pm 0,07$ cm y *m3* (M&S con 1,5 mg/L IBA), con un promedio de $3,30 \pm 0,07$ cm.

Longitud de la plántula a los 15 y 30 días para la interacción entre Especies y Medios de cultivo

Tukey al 5% a los 15 días para la interacción Especies por Medios de cultivo (tabla 37), identificó seis rangos de significancia, ubicando a *m2* como el medio de cultivo óptimo para *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido (*P. fortunei* x *P. elongata*) en el que se utilizó M&S suplementado con 0,4 mg/L de IBA. En el primer rango se ubicó a *P. fortunei*, con un promedio de $2,35 \pm 0,11$ cm, luego se ubicó a *P. elongata*, con un promedio de $2,27 \pm 0,11$ cm y finalmente se ubicó a *P. híbrido*, con un promedio de $1,82 \pm 0,11$ cm.

Tukey al 5% a los 30 días para la interacción Especies por Medios de cultivo (tabla 37), identificó cinco rangos de significancia, ubicando a *m2* como el medio de cultivo óptimo para *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido en el que se utilizó M&S suplementado con 0,4 mg/L de IBA, (anexo 16). En el primer rango se ubicó a *P. elongata*, con un promedio de $5,05 \pm 0,13$ cm, luego se ubicó a *P. fortunei*, con un promedio de $4,09 \pm 0,13$ cm y finalmente se ubicó a *P. híbrida*, con un promedio de $3,45 \pm 0,13$ cm (anexo 17).

Todos los tratamientos para enraizamiento utilizados en este trabajo presentaron un sistema radicular, no obstante, el uso de 0,4 mg/L IBA mejoró de manera significativa el proceso de diferenciación de raíces adventicias en brotes de *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido, en cuanto al número de raíces, altura de la planta y número de hojas. En todos los casos se observó un sistema de enraizamiento directo, sin la formación de callo, por lo que la adición de auxinas al medio de cultivo demostró ser óptimo para la etapa de enraizamiento *in vitro*.

Santos (2011, pág. 125), en el estudio de *Jacaranda*, en donde utilizó concentraciones de 0.01 ppm de IBA obtuvo una longitud promedio de 2.6 cm. Cáceres (2012, pág. 83), demostró que la concentración de hormona endógena es distinta en cada especie aunque pertenezcan a la misma Familia.

Ordóñez (2013, pág. 20), mencionan que, las respuestas fisiológicas son desencadenadas por la presencia de auxinas, además afirman que este fitoregulador (IBA) en bajas concentraciones favorece el crecimiento primario de la planta y estimulan los procesos de multiplicación celular. según Sunseri (2001, pág. 1), la concentración de auxina aplicada para su correcta función, depende de los niveles naturales de la auxina presente en el explante al inicio de la fase de enraizamiento, de la capacidad del tejido para sintetizar la auxina endógena y la interacción entre la auxina endógena y sintética, por lo tanto el aumento de la dosis de auxina ocasiona que los sistemas saturables mejor conocidos como receptores, son inhibidos a altas concentraciones de hormona, disminuyendo una de sus funciones importantes que es la elongación celular.

Tabla 37:

Promedios y pruebas de significación para la longitud de la plántula (cm) a los 15 y 30 días para la evaluación del enraizamiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).

Factores	Código	Longitud de la plántula (cm)	
		15 días	30 días
ESPECIES (E)	e1 (<i>Paulownia elongata</i>)	2,00 ± 0,06 a	4,44 ± 0,07 a
	e2 (<i>Paulownia fortunei</i>)	1,83 ± 0,06 a	3,71 ± 0,07 b
	e3 (<i>Paulownia</i> híbrida)	1,28 ± 0,06 b	2,73 ± 0,07 c
MEDIO DE CULTIVO (M)	m1 (M&S+ 0,2 mg/L ANA + 0,4 mg/L IBA)	1,59 ± 0,06 b	3,39 ± 0,07 b
	m2 (M&S+ 0,4 mg/L IBA)	2,15 ± 0,06 a	4,20 ± 0,07 a
	m3 (M&S+ 1,5 mg/L IBA)	1,38 ± 0,06 c	3,30 ± 0,07 b
E x M	e1m1	1,82 ± 0,11 bcd	4,31 ± 0,13 b
	e1m2	2,27 ± 0,11 ab	5,05 ± 0,13 a
	e1m3	1,92 ± 0,11 abc	3,96 ± 0,13 bc
	e2m1	1,77 ± 0,11 cd	3,30 ± 0,13 d
	e2m2	2,35 ± 0,11 a	4,09 ± 0,13 b
	e2m3	1,37 ± 0,11 de	3,75 ± 0,13 bcd
	e3m1	1,18 ± 0,11 ef	2,56 ± 0,13 e
	e3m2	1,82 ± 0,11 bcd	3,45 ± 0,13 cd
	e3m3	0,84 ± 0,11 f	2,19 ± 0,13 e

Nota: A. Cárdenas, 2014

3.5 Fase IV: Adaptación a condiciones de invernadero para plántulas obtenidas del sistema de micropropagación convencional

3.5.1 Porcentaje de prendimiento

La variable porcentaje de prendimiento a los 10 días, no presentó diferencia significativa. La tabla 38, muestra que los tratamientos T1 (e1s1), T2 (e2s1), T3 (e3s1), T4 (e1s2), T5 (e2s2) y T6 (e3s2) presentaron 100% de prendimiento.

La variable porcentaje de prendimiento a los 20, 30 y 45 días, (tabla 38), muestra que la adaptación para los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T6 (turba + vermiculita + perlita) se mantuvo en el 100% en cambio para el tratamiento T5 (tierra negra +

pomina) disminuyó el porcentaje de adaptación a 90% debido a la mortalidad de los explantes.

Clapa et al. (2014, págs. 6-14), obtuvieron un protocolo de enraizamiento *ex vitro* y aclimatación exitoso utilizando bolitas Jiffy7 y perlita flotante, con porcentajes de aclimatación de más del 80%, y unos brotes largos de 3-5 cm para *Paulownia elongata*, que comparado con el presente estudio utilizando el sustrato 1 (turba+ perlita+ vermiculita) presentó un 100% de prendimiento, para *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido; este método resultó ser barato, fácil y eficiente para obtener plantas de *Paulownia* jóvenes.

De igual forma Lobna, Taha, Soad, & Farahat (2008, págs. 594-600), trabajaron con *Paulownia kawakami* su investigación reportó un 90% de supervivencia, usando una mezcla de suelo con musgo, turba y arena en una proporción 1:1:1, resultados similares a los del presente estudio, alcanzando el 100% de prendimiento mediante el uso de turba, perlita y vermiculita. Mientras que Ipekci (2003, págs. 16-24), utilizó una mezcla de turba y perlita en una proporción de 3:1, las plantas de *P. elongata* fueron aclimatadas durante 2 meses en macetas y llevadas a un invernadero controlado, donde se obtuvo un 71,43% de supervivencia.

Las plantas obtenidas *in vitro* tienen: hojas delgadas, tallos débiles, raíces débiles y poco funcionales, conexión tallo-raíz incompleta, baja tasa fotosintética. El proceso de adaptación debe ser gradual, con disminución de la humedad relativa, crecimiento autotrófico y condiciones sépticas. Las plantas *in vitro* presentan poca capacidad de retención de agua. El desarrollo de las plantas *in vitro* permite una elevada humedad relativa en el interior de los frascos, baja intensidad luminosa, bajo intercambio gaseoso, abundante disponibilidad de nutrientes y carbono (generalmente en forma de sacarosa) y una pequeña variación de temperatura en un rango considerado óptimo para el cultivo (Aloísio, 1990, págs. 29-26), el presente estudio las plantas lograron sobrevivir al proceso de aclimatación.

Tabla 38:

Porcentajes de la variable prendimiento a los 10, 20, 30 y 45 días de evaluación en la fase IV de adaptación de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).

Tratamientos	Codificación	Porcentaje (%)			
		10 días	20 días	30 días	45 días
T1	e ₁ s ₁	100	100	100	100
T2	e ₂ s ₁	100	100	100	100
T3	e ₃ s ₁	100	100	100	100
T4	e ₁ s ₂	100	100	100	100
T5	e ₂ s ₂	100	90	90	90
T6	e ₃ s ₂	100	100	100	100

Descripción de la codificación:

e₁= *Paulownia elongata*

e₂= *Paulownia fortunei*

e₃= *Paulownia* híbrida

s₁= Turba+ perlita+ vermiculita

s₂= Pomina+ tierra negra

Nota: A. Cárdenas, 2014

3.5.2 Longitud de la planta

En el análisis de la varianza para la longitud de la planta a los 10 días, (tabla 39) se detectó alta significancia (<0,05) estadística para especies y sustratos, mientras que para la interacción ExS no detectó significancia (0,8415). El promedio de la variable longitud de planta fue de 4,93 cm y su coeficiente de variación fue de 25,16%, considerado muy bueno para este tipo de experimentos.

En el análisis de la varianza para la longitud de la planta a los 20 días, (tabla 39), se detectó significación estadística para especies (0,0011) y sustratos (<0,0001). El promedio de la variable longitud de planta fue 6,72 cm y su coeficiente de variación fue de 28,47%, considerado muy bueno para este tipo de experimentos.

En el análisis de la varianza para la longitud de la planta a los 30 días, (tabla 39), se detectó significación estadística para especies (0,0001) y sustratos (<0,0001). El promedio de la variable longitud de planta fue 9,60 cm y su coeficiente de variación fue de 28,25% considerado muy bueno para este tipo de experimentos.

En el análisis de la varianza para la longitud de la planta a los 45 días, (tabla 39), se detectó significación estadística para especies (0,0423) y sustratos (<0,0001). El promedio de la variable longitud de planta fue 12,68 cm con un coeficiente de variación de 21,95%, considerado muy bueno para este tipo de experimentos (anexo 18).

Tabla 39

ADEVA para la variable longitud de la planta evaluada a los 10, 20, 30 y 45 días en la etapa IV adaptación de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei x Paulownia elongata*).

F de V	10 días			20 días			30 días			45 días		
	(GL)	CM	p-valor	(GL)	CM	p-valor	(GL)	CM	p-valor	(GL)	CM	p-valor
TOTAL	59			59			59			59		
TRATAMIENTOS	5	10,11	0,0001	5	28,14	<0,0001	5	70,24	<0,0001	5	55,30	<0,0001
Especies (E)	2	11,67	0,0013	2	28,47	0,0011	2	84,35	0,0001	2	26,02	0,0423
Sustrato (S)	1	26,67	0,0001	1	74,82	<0,0001	1	147,27	<0,0001	1	198,02	<0,0001
E x S	2	0,27	0,8415	2	4,47	0,3029	2	17,62	0,1008	2	13,22	0,1913
ERROR EXPERIMENTAL	54	1,54		54	3,66		54	7,36		54	7,75	
Promedio	4,93			6,72			9,60			12,68		
CV	25,16%			28,47%			28,25%			21,95%		

Nota: A. Cárdenas, 2014

Longitud de la planta a los 10, 20, 30 y 45 días para Especies

Tukey al 5% a los 10 días para especies (tabla 40), identificó dos rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *e1* (*Paulownia elongata*) con un promedio de $5,60 \pm 0,28$ cm; y se ubicó a *e3* (*Paulownia* híbrida), con un promedio de $5,10 \pm 0,28$ cm, en el segundo rango se ubicó *e2* (*Paulownia fortunei*) con un promedio de $4,10 \pm 0,28$ cm.

Tukey al 5% a los 20 días para especies (tabla 40), identificó dos rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *e1* (*Paulownia elongata*) con un promedio de $8,05 \pm 0,43$ cm; en segundo rango se ubicó a *e3* (*Paulownia* híbrida), con un promedio de $6,35 \pm 0,43$ cm y se ubicó *e2* (*Paulownia fortunei*) con un promedio de $5,75 \pm 0,28$ cm.

Tukey al 5% a los 30 días para especies (tabla 40), identificó dos rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *e1* (*Paulownia elongata*) con un promedio de $11,90 \pm 0,61$ cm; en segundo rango se ubicó a *e2* (*Paulownia fortunei*), con un promedio de $8,95 \pm 0,61$ cm y se ubicó *e3* (*Paulownia* híbrida) con un promedio de $7,95 \pm 0,61$ cm.

Tukey al 5% a los 45 días para especies (tabla 40), identificó dos rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *e1* (*Paulownia elongata*) con un promedio de $13,70 \pm 0,62$ cm; en segundo rango se ubicó a *e2* (*Paulownia fortunei*), con un promedio de $12,90 \pm 0,62$ cm y se ubicó *e3* (*Paulownia* híbrida) con un promedio de $11,45 \pm 0,62$ cm

Longitud de la planta a los 10, 20, 30 y 45 días para Sustratos

Tukey al 5% a los 10 días para sustratos (tabla 40), identificó dos rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *s1* (turba, perlita y vermiculita), con un promedio de $5,60 \pm 0,23$ cm; en el segundo rango se ubicó *s2* (tierra negra y pomina), con un promedio de $4,27 \pm 0,23$ cm.

Tukey al 5% a los 20 días para sustratos (tabla 40), identificó dos rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *s1* (turba, perlita y vermiculita), con un promedio de $7,83 \pm 0,35$ cm; en el segundo rango se ubicó *s2* (tierra negra y pomina), con un promedio de $5,60 \pm 0,35$ cm.

Tukey al 5% a los 30 días para sustratos (tabla 40), identificó dos rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *s1* (turba, perlita y vermiculita), con un promedio de $11,17 \pm 0,50$ cm; en el segundo rango se ubicó *s2* (tierra negra y pomina), con un promedio de $8,03 \pm 0,50$ cm.

Tukey al 5% a los 45 días para sustratos (tabla 40), identificó dos rangos de significación estadística. En el primer rango con la mejor respuesta se encontró *s1* (turba, perlita y vermiculita), con un promedio de $14,50 \pm 0,51$ cm; en el segundo rango se ubicó *s2* (tierra negra y pomina), con un promedio de $10,87 \pm 0,51$ cm.

Longitud de la plántula a los 10, 20, 30 y 45 días para la interacción entre Especies y Sustratos

Tukey al 5% a los 10 días para la interacción Especies por Sustratos (tabla 40), identificó tres rangos de significancia, ubicando a *sI* como el sustrato óptimo para *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido en el que se utilizó turba, perlita y vermiculita. En el primer rango se ubicó a *P. elongata* con un promedio de $6,20 \pm 0,39$ cm, luego se ubicó a *P. híbrida*, con un promedio de $5,70 \pm 0,39$ cm y finalmente se ubicó a *P. fortunei*, con un promedio de $4,90 \pm 0,39$ cm.

Tukey al 5% a los 20 días para la interacción Especies por Sustratos (tabla 40), identificó tres rangos de significancia, ubicando a *sI* como el sustrato óptimo para *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido en el que se utilizó turba, perlita y vermiculita. En el primer rango se ubicó a *P. elongata* con un promedio de $9,00 \pm 0,60$ cm, luego se ubicó a *P. fortunei*, con un promedio de $7,40 \pm 0,60$ cm y finalmente se ubicó a *P. híbrida*, con un promedio de $7,10 \pm 0,60$ cm.

Tukey al 5% a los 30 días para la interacción Especies por Sustratos (tabla 40), identificó tres rangos de significancia, ubicando a *sI* como el sustrato óptimo para *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido en el que se utilizó turba, perlita y vermiculita. En el primer rango se ubicó a *P. elongata* con un promedio de $12,90 \pm 0,86$ cm, luego se ubicó a *P. fortunei*, con un promedio de $11,60 \pm 0,86$ cm y finalmente se ubicó a *P. híbrida*, con un promedio de $9,00 \pm 0,86$ cm.

Tukey al 5% a los 45 días para la interacción Especies por Sustratos (tabla 40), identificó dos rangos de significancia, ubicando a *sI* como el sustrato óptimo para *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido en el que se utilizó turba, perlita y vermiculita. En el primer rango se ubicó a *P. fortunei*, con un promedio de $15,60 \pm 0,88$ cm, luego se ubicó a *P. elongata*, con un promedio de $14,80 \pm 0,88$ cm y finalmente se ubicó a *P. híbrida*, con un promedio de $13,10 \pm 0,88$ cm (anexo 19).

En el presente estudio, se utilizó turba, debido a su estructura ya que posee una excelente porosidad y es buena receptora de soluciones nutritivas, proporcionando gran aireación a las raíces, además está libre de gérmenes y semillas de malas hierbas y es bastante ligera, después de su humedecimiento y abonado puede ser utilizada

inmediatamente, a su vez añadido minerales tales como la perlita que es de origen volcánico y tiene la forma de partículas blancas de poco peso, estériles, posee una capacidad de retención de agua de hasta 5 veces su peso y tiene un pH de 7-7,5 y además, al sustrato se añadió minerales como la vermiculita, que es un tipo de mica que da al sustrato buena capacidad de intercambio iónico, es decir, de retener nutrientes, aporta igualmente porosidad con un pH de 7-7,2 (Árboles ornamentales, 2014, pág. 1). Éstas características aportaron a la retención de agua y nutrientes a las plantas de *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido, evitando así los niveles de deshidratación y, posiblemente en el presente estudio esta mezcla de elementos aportaron buenas características durante el proceso de aclimatación tales como un tallo grueso, hojas anchas, entre otras.

Tabla 40:

Promedios y pruebas de significación para la variable longitud de la planta a los 45 días para la evaluación de la adaptación de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).

Factores	Código	Longitud de planta (cm)			
		15 días	20 días	30 días	45 días
ESPECIES (E)	e1 (<i>Paulownia elongata</i>)	5,60 ± 0,28 a	8,05 ± 0,43 a	11,90 ± 0,61 a	13,70 ± 0,62 a
	e2 (<i>Paulownia fortunei</i>)	4,10 ± 0,28 b	5,75 ± 0,43 b	8,95 ± 0,61 b	12,90 ± 0,62 ab
	e3 (<i>Paulownia</i> híbrida)	5,10 ± 0,28 a	6,35 ± 0,43 b	7,95 ± 0,61 b	11,45 ± 0,62 b
SUSTRATO (S)	s1 (turba + perlita +vermiculita)	5,60 ± 0,23 a	7,83 ± 0,35 a	11,17 ± 0,50 a	14,50 ± 0,51 a
	s2 (tierra negra + pomina)	4,27 ± 0,23 b	5,60 ± 0,35 b	8,03 ± 0,50 b	10,87 ± 0,51 b
E x S	e1s1	6,20 ± 0,39 a	9,00 ± 0,60 a	12,90 ± 0,86 a	14,80 ± 0,88 a
	e1s2	5,00 ± 0,39 ab	7,10 ± 0,60 ab	10,90 ± 0,86 ab	12,60 ± 0,88 ab
	e2s1	4,90 ± 0,39 abc	7,40 ± 0,60 ab	11,60 ± 0,86 ab	15,60 ± 0,88 a
	e2s2	3,30 ± 0,39 c	4,10 ± 0,60 c	6,30 ± 0,86 c	10,20 ± 0,88 b
	e3s1	5,70 ± 0,39 ab	7,10 ± 0,60 ab	9,00 ± 0,86 bc	13,10 ± 0,88 ab
	e3s2	4,50 ± 0,39 bc	5,60 ± 0,60 bc	6,90 ± 0,86 c	9,80 ± 0,88 b

Tukey 5%
DMS 5%

Nota: A. Cárdenas, 2014

CONCLUSIONES

Se acepta la hipótesis alternativa, la cual afirma que *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) responden a la propagación masiva *in vitro*, bajo el sistema convencional e inmersión temporal, en condiciones del laboratorio de cultivo de tejidos de la Estación Santa Catalina del INIAP.

El protocolo de desinfección óptimo para el establecimiento *in vitro* de *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido (*P. fortunei* x *P. elongata*) fue el protocolo 3 (povidyn jabón y tween 20 durante 10 minutos a 70 RPM+ povidyn 1% y agua destilada durante 10 minutos a 70 RPM +Benomyl (benzimidazol) 1 g/L, Phytol (sulfato de cobre pentahidratado) 1% + PVP (Polivinilpirrolidona) 3 g/L y Rifampicina 0,5 mL/L durante 1 hora a 70 RPM + hipoclorito de sodio 1%(v/v) , ácido ascórbico 100 mg/L y 2 gotas de tween 20 durante 10 minutos a 70 RPM), el cual mostró los mejores resultados, obteniendo un porcentaje de oxidación y contaminación de 0%.

El medio de cultivo óptimo para la etapa de multiplicación *in vitro* bajo el sistema convencional fue el m3 (M&S, 6g/L de agar más 30 g/L de azúcar suplementado con 0,2 mg/L BAP), para *P. elongata*, *P. fortunei* y un híbrido (*P. fortunei* x *P. elongata*), con una altura promedio de 9,53±0,08 cm; 8,34±0,08 cm y 6,24±0,08 cm y un índice de multiplicación a los 30 días de 17,5; 15,5; y 17,7; respectivamente.

El medio de cultivo que se utilizó para la etapa de multiplicación *in vitro* bajo el Sistema de Inmersión Temporal fue m3 (M&S + 6 g/L agar+ 30 g/L azúcar+ 0,2 mg/L BAP). La frecuencia de 3 horas con un tiempo de inmersión de un minuto para *P. fortunei*, *P. elongata* y *P. híbrida*, fueron las que presentaron resultados óptimo, presentando alturas promedios de 1,61±0,01 cm; 0,94±0,01 cm y 0,85±0,01 cm, respectivamente.

En la evaluación a los 30 días el medio de cultivo más eficiente para la etapa de enraizamiento *in vitro* fue el medio m2 (M&S, 7 g/L de agar, 30 g/L de azúcar suplementado con 0,4 mg/L IBA), con un promedio de número de raíces de 9,30±0,24; 7,40±0,24 y 6,90±0,24 y un promedio de longitud de la raíz de 3,22±0,16

cm; $5,40 \pm 0,16$ cm y $7,03 \pm 0,16$ cm para *P. híbrida*, *P. fortunei* y *P. elongata*, respectivamente.

En la evaluación a los 45 días el sustrato óptimo para la variable porcentaje de prendimiento fue el *s1* (Turba + perlita 10% + vermiculita 10%) mostrando obtener un 100% de supervivencia, con un promedio de longitud de la planta de $14,80 \pm 0,88$ cm; $15,60 \pm 0,88$ cm y $13,10 \pm 0,88$ cm para *P. elongata*, *P. fortunei*, y *P. híbrida*, respectivamente

RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar el protocolo de desinfección N°3 (povidyn jabón y tween 20 + povidyn 1% y agua destilada + Benomyl 1 g/L, Phyton 1%, PVP 3 g/L y Rifampicina 0,5 mL/L + hipoclorito de sodio 1%(v/v), ácido ascórbico 100 mg/L y 2 gotas de tween 20) para el establecimiento *in vitro* de especies del género *Paulownia*.

Se sugiere utilizar el medio de cultivo *m3* (M&S 1X + 0,2 mg/L BAP) para la etapa de multiplicación *in vitro* de especies del género *Paulownia*.

Se recomienda utilizar el medio de cultivo *m2* (M&S + 0,4 mg/L IBA) para la etapa de enraizamiento *in vitro* de especies del género *Paulownia*.

Se propone utilizar el sustrato *s1* (turba + perlita + vermiculita) para la etapa de aclimatación de especies del género *Paulownia*.

Es recomendable evaluar técnicas alternativas para la multiplicación como embriogénesis somática, debido a la capacidad callogénica de los explantes de las especies del género *Paulownia*.

Se sugiere evaluar los sistemas de inmersión temporal en un periodo mayor a los 30 días, para generar brotes con mayores longitudes y mayor cantidad de nudos.

Ensayar el enraizamiento de explantes de *Paulownia* directamente a sustrato sin pasar por la etapa de enraizamiento, mediante el sistema autotrófico hidropónico (SAH), con la finalidad de ahorrar tiempo, reactivos y espacio.

LISTA DE REFERENCIAS

- Abdelnour, A., & Vincent, J. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*, Centro Interamericano de Documentación e Información Agrícola, IICA – CIDIA. Costa Rica: CIDIA.
- Aguilar, M., Vilalobos, V., & Salgado, R. (2001). *Cultivo in vitro de Paulonia (Paulownia tomentosa)*. Mexico: inifap.
- Aitken-Christie, J., Kozai T, & Takayama, S. (1995). Automation in plant tissue culture - general introduction and overview. *Kluwer Academic Publisher*, 24 - 32.
- Alatorre, C. (2002). *Estudio morfogénico e histológico del híbrido Vanilla planifolia x Vanilla pompona Schiede obtenido in vitro*. Chapingo-México: Tesis. Bach. Agr. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Abdelnour- Esquivel, A., & Escalant, J. .. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. CATIE.
- Alemán, S. (2000). *Propagación vegetativa*. Recuperado el 12 de Octubre de 2014, de Universidad de Matanzas Camilo: <http://agroweb.umcc.cu/PaginasProfesores/Silvia%20PAG%20WEB%20BIO%20TECNOLOGÍA/silvia2/Páginas%20de%20la%20portada/Pagina%20tema%20OIV.htm>
- Aloísio, X. (1990). Enraizamiento in vitro de gemas de Eucalyptus multiplicados me alongados. *Revista Scientia Forestalis*, 51, 29-26.
- Alvaro, Y., Herrera, L., Suárez, M., Rivero, O., García, L., & Acosta, M. (1997). *Control de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas*. Habana, Cuba: Resúmenes Tercer Seminario Internacional de Sanidad Vegetal.
- Amiot, M., Forget, F., & Goupy, P. (1996). *Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymtic and non-enzymatic derived products* (Vol. 42). Herba-Polonica.

- Arauz, L. (1998). *Fitopatología: un enfoque agroecológico*. San José: Universidad de Costa Rica.
- Árboles ornamentales. (2014). *Árboles ornamentales/turbas*. Recuperado el 24 de Enero de 2015, de <http://www.arbolesornamentales.es/Turbas.htm>
- Ascon, B., & Talon, M. (1993). *Fisiología y bioquímica vegetal*. (1. edición, Ed.) Madrid-España: Mc Graw-Hill.
- Azofeifa, A. (2009). *Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*.
- Ball, E. (1950). Differentiation in callus culture of *Sequoia sempervirens*. *Growth*, 14, 295-325.
- Becerra, V., Paredes, M., Luengo, U., & Rodón, R. (2012). Protocolo de propagación masiva de *Paulownia* sp. en el Sistema de Inmersión Temporal (SIT) usando biorreactores. *INNOVA*, 45-60.
- Bergmann, B., & Moon, H.-K. (1997). In vitro adventitious shoot production in *Paulownia*. *Plant Cell Reports, Springer-Verlag*, 16, 315-317.
- Berthouly, M., Dufour, M., Alvard, D., Carasco, C., Alemanno, L., & Teisson, C. (1995). Coffe micropropagation in a liquid medium using the temporary immersion technique. *International Scientific Colloquium on Coffee*, 514-519.
- Biondi, S., & Thorpe, T. (1982). Clonal propagation of forest tree species. *Rao A.N*, 197-199.
- Botello, A., Rendón, J., Gold-Bouchot, G., & Agraz-Hernández, C. (2005). *Contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. México: Universidad Autónoma de Campeche.
- Bouman, H., & Tiekstra, A. (2005). Adaptations of mineral composition of mineral tissue culture media on the basis of plant analysis and composition of hidroponic substrates. *Springer-Verlag*, 493-508.

- Bray, E., Bailey-Seres, J., & Weretilnyk, E. (2000). *sponses to abiotic stresses*. In: Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. USA: American Society of Plant Physiologists. Maryland.
- Burger, D., Liu, L., & Wu, L. (1985). Rapid micropropagation of *Paulownia tomentosa*. *Hort Science*, 20, 760-761.
- Cabrera, M., Gómez, R., Basail, M., Santos, A., Mederos, V., López, J., y otros. (2005). Production of yam microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 83(1), 103-107.
- Cáceres, G. (2012). *Cultivo in vitro de meristemas de plantas, previamente obtenidas por germinación in vitro de semillas de cholán (Tecoma stans)*. Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida e Ingeniería en Biotecnología.
- Carmona, M. (2005). *Enfermedades de fin de ciclo y roya asiática de la soja; un análisis de sus daños y el uso estratégico de fungicidas*. Córdoba: INTA;CREA;AAPRESID.
- Cassells, A. (1991). *Problem in tissue culture: culture contamination*. (P. Debergh, & H. Zimmerman, Edits.) Dordrecht: Academic Publishers.
- Castellanos, O., Rodríguez, A., Rodríguez, J., & Rodríguez, B. (2006). Organogénesis indirecta y enraizamiento in vitro de *Paulownia elongata*. *Redalyc*, 4(15), 1-12.
- Castillo, A. (2004). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. Recuperado el 4 de Febrero de 2015, de http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382
- Castillo, C. (2007). *Transformación genética de Paulownia elongata mediada por Agrobacterium tumefaciens y por biobalística*. 2007: Montecillo.
- Castillo, C., Gutiérrez, A., Buenrostro, M., & Cetina, V. (2012). Regeneración de plantas de *Paulownia elongata* Steud. por organogénesis directa. *Revista Mexicana Científica*, 3(10), 41-49.

- Castro, D., Díaz, J., & Montoya, N. (2001). *Clonal propagation of bananas by biorreactors of temporary immersion*. Colombia: Memorias XV Reunión: Realizada en Cartagena de Indias.
- Chee, R., & Pool, R. (1982). The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultures in vitro. *Scientia Horticulture*, 16, 17-27.
- Chinchilla, I. (2008). *Establecimiento y cultivo in vitro de Pouteria sapota (Jacquin H. E. Moore & Stearn)*. Costa Rica: Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. Escuela de Biología Licenciatura en Genética y Biotecnología.
- Chung, P., & Carrasco, B. (2002). *Aldeaforestal*. (U. d. Salamanca, Editor) Recuperado el 1 de Febrero de 2015, de Micropropagación de *Salix* spp a través de meristemas foliares: www.aldeaforestal.d/ñemu/webLemumayo.01/ciencia/articulos2htm.
- CIAT. (1991). Establecimiento de cultivo de tejidos de vegetales in vitro. En *Cultivo de tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones* (pág. 20). Cali-Colombia.
- Clapa, D., Fira, A., Manuela, S., Vasu, L., & Buduroi, D. (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.
- Clatterbuck, W., & Hodges, D. (2004). *Tree Crops for Marginal Farmland, Paulownia*. Estados Unidos: nonprofit educational purposes.
- Colmenares, M., & Giménez, C. (2003). Multiplicación in vitro *Musa* spp. mediante sistema de inmersión temporal. *Fac. Agron. (LUZ)*, 20, 468-477.
- Corredoira, E., Cernadas, J., & San, M. (2010). Inducción de yemas adventicias en *Paulownia tomentosa* estudio anatómico del proceso caulogénico. *Revista Real Academia Galega de Ciencias*, 29, 5-22.
- Damiano, C., Gentile, A., La Starza, S., Frattarelli, A., & Monticelli, S. (2003). Automation in micropropagation through temporary immersion techniques. *Acta Horticulturae*, 616, 359 - 364.

- Danby, S., Epton, H., Sigeo, D., & Leifert, C. (1994). *Fungal contaminants of Primula, Coffea, Musa and Iris tissue cultures*. (P. Lumsden, J. Nicholas, & B. Davie, Edits.) Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Debergh, P., Aitken, J., Cohen, B., Von, A., Zimmerman, R., & Ziv, M. (1992). Reconsideration of the term “vitrification” as used in micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 30, 135–140.
- Debergh, P. (1991). *Micropropagation*. Netherlands: Kluwer Acad.Publ.
- Dottin, M. (2000). *Propagación in vitro de la malanga (Xanthosoma sagittifolium (L) Schoott)*. Santa Clara, Cuba: Universidad Central de Las Villas.
- EcuRed. (2011). *Sistema de inmersión temporal*. Recuperado el 11 de Noviembre de 2013, de http://www.ecured.cu/index.php/Sistema_de_Inmersi%C3%B3n_Temporal
- Eide, C., Munster, P., Heyerdahl, R., & Lyngved, O. (2003). *Liquid culture system for plant propagation*, 625:.. Recuperado el 12 de Junio de 2014, de Acta Horticulturae: http://www.actahort.org/book/625/625_18.htm
- Enjalric, Y., Carron, M., & Lardet, L. (1988). *Contamination of primary cultures in tropical areas: the case of Hevea brasiliens*. Acta Horticulturae.
- Escalona, M., Lorenzo, J., González, B., Daquinta, M., Fundora, Z., Borroto, C., y otros. (1998). *Pineapple (Ananas comosus L. Merr.) micropropagation in temporary immersion systems*. (Vol. 18). Plant Cell Reports.
- Escalona, M., Lorenzo, J., González, B., Daquinta, M., González, J., Desjardins, Y., y otros. (1999). *Pineapple (Ananas comosus L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems*. (Vol. 18). Plant Cell Rep.
- Etienne, H., & Berthouly, M. (2005). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ cult*, 69, 215-231.
- FAO. (2004). *Forest Genetic Resources Working Papers Preliminary review of biotechnology in forestry, including genetic modification*. Recuperado el 12 de Junio de 2014, de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/008/ae574e/ae574e00.pdf>

- FAO. (2010). *Global Forest Resources Assesment*. Recuperado el 23 de Octubre de 2013, de Main Report : <http://www.fao.org/docrep/013/i1757e/i1757e.pdf>
- García, M., Quintero, R., & López, A. (2004). *Biotechnología alimentaria*. México: Limusa.
- Garden Center Ejea Ctra. (2014). *Paulownia fortunei x elongata*. Recuperado el 19 de Octubre de 2014, de <http://www.gardencenterejea.com/producto.php/plantas/arboles/arboles-de-gran-porte/paulownia-fortunei-x-elongata/1356>
- George, E. (1993). *Plant propagation by tissue culture*. (2. edición, Ed.) Exergetics Ltd.
- González, K. (2003). *Respuesta de tres explantes de vainilla (Vanilla planifolia) a diferentes frecuencias de inmersión temporal*. Cartago-Costa Rica: Tesis. Bach. Ing. Biot.
- González, K. (2003). *Respuesta de tres explantes de vainilla (Vanilla planifolia) a diferentes frecuencias de inmersión temporal*. Cartago: Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- González, R., Ríos, D., Avilés, F., & Sánchez, M. (2011). Multiplicación in vitro de *Eucalyptus globulus* mediante sistema de inmersión temporal. *SciELO*, 32(2), 147-154.
- Grijalva, J., Raúl, R., Barrera, P., & Limongi, R. (2012). *Situación de Iso recursos genéticos forestales en Ecuador*. Quito: Ximena Checa.
- Guerra, M., & Nodari, R. (2004). *Biotechnología*. Recuperado el 10 de Junio de 2014, de Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, Brasil: <http://www.cca.ufsc.br/ldgv/style.css>
- Guohua, M. (1998). Effects of cytokinins and auxins on cassava shoot organogenesis and somatic embriogenesis from somatic embryo xplants. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 54(1), 1-7.

- Gutiérrez, J., & Ocaña, R. (2009). *Manual para el cultivo de Paulownia elongata*. Estado de México: Dirección de difusión y promoción de la investigación y los estudios avanzados.
- Hartman, H., & Kester, D. (1975). *Plant propagation: principles and practices*. Engelwood: Prentice Hall.
- Herman, E. (1987). *Toward control of micropropagation contamination* (Vol. 9). Agricell.
- INAMHI. (2014). Estación Meteorológica Izobamba. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Instituto de Bienestar Rural. (1977). *Manual Básico de Cultivo de KIRI (Paulownia sp.)*. Paraguay: Publicaciones de Extensión Agraria.
- Ipekci, Z., & Gozukirmizi, N. (2003). Direct Somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. *Plant Cell Rep*, 22, 16-24.
- Ipekci, Z., Atinkut, A., Kazan, K., Bajrovic, K., & Gozukirmizi, N. (2001). High frequency plant regeneration from nodal explants of *Paulownia elongata*. *Plant Biol*, 113-115.
- Jácome, A. (2011). *Micropropagación in vitro de la especie endémica Jiguerón (Aegiphila ferruginea) para la producción masiva y conservación de esta especie en peligro de extinción*. Quito: ESPE.
- Jiménez, R. (2005). *Respuesta morfogénicas de la piña (Ananas comosus) en diferentes sistemas de cultivo in vitro*. Costa Rica: Escuela de Agronomía del Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Jones, F. (2006). *Establecimiento in vitro y micropropagación de frambuesa (Rubus idealus) utilizando medio semisólido y medios líquidos*. Catargo, CR. Instituto Tecnológico de Costa Rica: Tesis de grado previa la obtención título de Ingeniera Biotecnóloga.
- Kembo, J., & Hornung, R. (1999). *Initiation of Callus in Cashew nut, Anacardium occidentale L. from Plumular-and Cotyledonary Tissue Excised from Mature Nuts*. Unit for Advanced Propagation Systems, Wye College. London: University of London.

- Kozai, T., & Smith, M. (1995). Environmental control in plant tissue culture – general introduction and overview. In: Aitken- Christie J, Kozai T and Smith MAL. *Plant Tissue Culture*, 301-318.
- Krikorian, A. (1991). *Propagación clonal in vitro*. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia: William Roca y Luis A. Mroginski.
- Kumar, P., Rao, C., & Goh, C. (1998). Influence of petiole and lamina on adventitious shoots initiation from leaf explants of *Paulownia fortunei*. *Plant Cell*, 17, 886-890.
- Lahera, J. (2010). *Guía de facilitación para el trabajo con la literatura de referencia sobre la flora de Cuba*. Cuba: Feijóo.
- Landscape Plant Focus. (2013). *Paulownia*. *Horticulture week*, 20.
- LCT Laboratorio de cultivo de tejidos, Departamento de Nacional de Biotecnología, INIAP. (2014). Quito, Pichincha, Ecuador.
- Limongi, R., Guiracocha, G., & Yépez, C. (2011). *Amarillo de Guayaquil (Centrolobium ocoxylum Rose ex Rudd) especie de uso múltiple del bosque seco del Ecuador, INIAP 73, Estaciones Experimentales del Litoral Sur & Portoviejo*. MAGAP-SENESCYT. Manta: Cgraf.
- Lobna, S., Taha, M., Soad, I., & Farahat, M. (2008). A Micropropagation Protocol of *Paulownia kowakamii* through in vitro culture technique. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(3), 594-600.
- Low, R., Prakash, A., Swarup, C., & Kumar, P. (2001). A differentially expressed bZIP gene is associated with adventitious shoot regeneration in leaf cultures of *Paulownia kawakamii*. *Plant Cell Reports*, 20(8), 696-700.
- Lozano, Z. (2011). *Establecimiento de un protocolo para la propagación in vitro de Guarango *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, a partir de plántulas como herramienta para la preservación de esta especie*. Quito: ESPE.
- Lucas, M. E., Martínez, E., López, F. R., Abellan, M. A., García, F. A., & Pérez, D. C. (2011). El cultivo forestal de *Paulownia* spp: Primeros resultados de su aplicación en Castilla La Mancha. *Gestión Forestal*(47-48), 1-2.

- MAE. (2011). *Estimación de la Tasa de Deforestación del Ecuador continental*. Recuperado el 11 de Noviembre de 2014, de http://www.ambiente.gob.ec/sites/default/files/users/mponce/TasasDeforestación Ecuador.Ver_.03.05.11.pdf.
- Marín, J., & Moll, H. (1997). *La micropropagación y la mejora de especies frutales*.
- McAlister, B., Finnie, J., Watt, M., & Blakeway, F. (2005). Use of temporary immersion bioreactor system (RITA) for production of commercial Eucalyptus clones in Mondi Forest (SA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81(3), 347-358.
- Melhuish, J., Gentry, C., & Beckjord, P. (1990). *Paulownia tomentosa seedling growth at different levels of pH, nitrogen and phosphorus* (Vol. 8). Environ,Hortic.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. (2013). *Programa de incentivos para la reforestación con fines comerciales*. Guayaquil-Ecuador: MAGAP.
- Ministerio del medio ambiente . (Abril de 2013). *Hipoclorito de sodio*. Recuperado el 3 de Enero de 2015, de <http://www.minambiente.gov.co/documentos/Guia18.pdf>
- Miranda, O. (2014). *Evaluación y selección in vitro de materiales promisorios de tomate de árbol (Solanum betaceum Cav.), resistentes/ tolerantes a la antracnosis (Colletotrichum spp)*. Santo Domingo de los Tsáchilas: ESPE.
- Molina, M. (2014). *Ciencia sin seso...locura doble*. Recuperado el 5 de Diciembre de 2014, de <http://www.cienciasinseso.com/tag/transformar-datos/>
- Newcomb, R. (2010). *Asset Investment Management*. San Diego-Estados Unidos: San Diego State University Technologies and Security Director of Operations.
- One green future. (2009). *Especies de Paulownia*. Recuperado el 19 de Octubre de 2014, de <http://fil.bg/clients/paulownia/index.php?ekod=en&menu=26>
- Ordóñez, M. (2013). *Evaluación de medios de cultivo sobre las fases de micropropagación in vitro de la especie forestal nativa Yagual (Polylepis*

- incana*). Sangolquí: Tesis Ing. En Biotecnología. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida e Ingeniería en Biotecnología.
- Pedroza, J., González, S., & Téllez, D. (2007). Micropropagación de *Dodonea viscosa* (L) Jacq: una especie en vías de extinción. *Colombia Biotecnología*, 9(2), 33-44.
- Pérez, F. (2004). *Cultivo in vitro de plantas y sus aplicaciones en la Agricultura*. Arte Comunicación Visual S.L.
- Pérez, J. (1998). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. (Y. Alvarado, R. Gómez, E. Jiménez, & P. Orellana, Edits.) Santa Clara-Cuba: GEO.
- Pérez, J. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. *Instituto de Biotecnología de las plantas*, 391-393.
- Perrugoría, M. (2012). *Desarrollo de una técnica para micropropagación de especies leñosas en biorreactores*. Recuperado el 5 de Diciembre de 2013, de <http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/biotec/uy24-15708>
- Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. España: Mundi-Prensa.
- Pompeu, G. G., Vitorello, V., & Azevedo, R. (2008). Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. *Scientia Agricola*, 65, 548-552.
- Preil, W. (2005). General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for in vitro culture. *Springer-Verlag*, 1-20.
- Ramírez, J., & Sáinz, R. (2013). *Monografías.com*. Recuperado el 11 de Septiembre de 2014, de <http://www.monografias.com/trabajos89/produccion-semilla-papa-solanum-tuberosum/produccion-semilla-papa-solanum-tuberosum2.shtml>
- Ramos, J. (2012). *Avances de la micropropagación in vitro de plantas leñosas*. Bogotá: especialización en biotecnología agraria Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD).

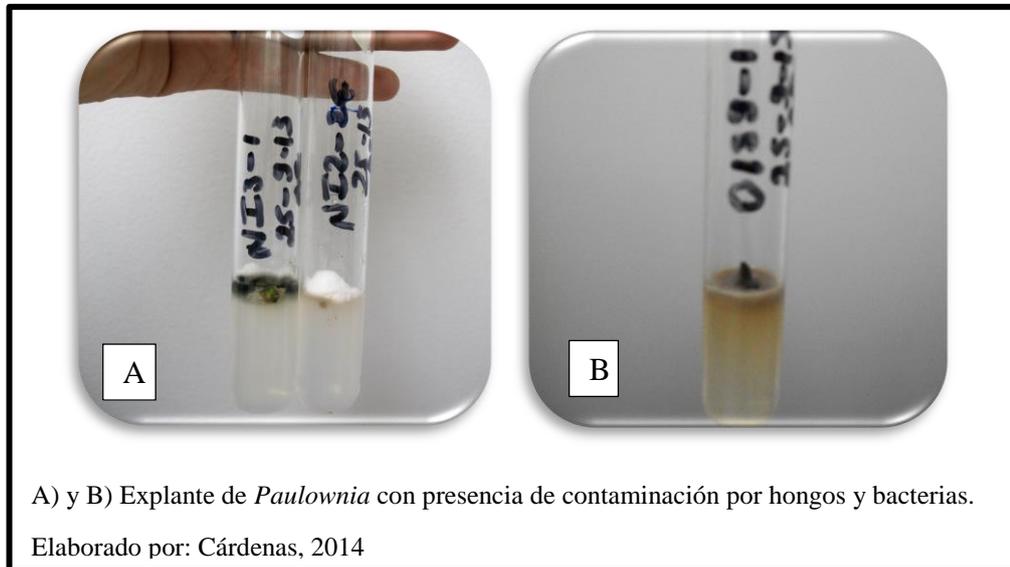
- Rao, C., Goh, C., & Kumar, P. (1993). High frequency plant regeneration from excised leaves of *Paulownia fortunei*. *In vitro Cell Dev Biol*, 72-76.
- Recalde, C. (2007). *Establecimiento del cultivo in vitro y aclimatación en invernadero de nepeta hederacea variegata*. Quito: ESPE.
- RED COUNTRIES DATABASE. (2012). *Ecuador en resumen*. Recuperado el 2013 de Septiembre de 25, de www.THEREDDDESK.ORG/COUNTRIES/ECUADOR
- Rivero, M. (2011). *Cultivo de tejidos vegetales*. Mexico.
- Roca, W., & Mroginski, L. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones; Establecimiento de cultivo de tejidos in vitro*. Cali-Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Roca, W., & Mroginski, L. (1991). *Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales in vitro, in Cultivo de tejidos en la agricultura*. Cali, Colombia: Eds. Roca y Mroginski.
- Rodes, M. (2014). *Estudio de adaptabilidad de tres especies forestales del género Paulownia (P. fortunei, P. elongata y P. elongata x fortunei) a las condiciones de sitio de Bosque Seco, provincia de Loja durante el primer año de establecimiento*". Quito-Ecuador: Universidad Politécnica de Madrid (UPM).
- Rojas, S., García, J., & Alarcón, M. (2004). *Propagación asexual de plantas. Conceptos básicos y Experiencia con Especies Amazónicas*. Colombia: Corpoica (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria).
- Ross, J., & Neill, D. (2000). New interaction between classical plant hormones. *Trends in plant Science*, 7, 2-4.
- Rout, G., Reddy, G., & Das, P. (2001). Studies on in vitro clonal propagation of *Paulownia tomentosa* Steud and evaluation of genetic fidelity through RAPD marker. *Silvae Genetica*, 50, 208-212.
- Santos, W. (2011). *Propagação in vitro de Jacaranda ulei Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae)*. Brasília: Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica.

- Sedder. (2003). *The Paulownia Tree, an alternative for sustainable forestry*. Recuperado el 12 de Septiembre de 2014, de <http://www.cropdevelopment.org>
- Sharma, S., Charan, S., & Dihman, R. (2003). Regeneration and multiplication of *Paulownia fortunei* (CO20 clone) through shoot tip culture. *Indian Journal of Soil Conservation*, 31, 276-280.
- Sierra de Grado, R. (2002). *El Álamo temblón (Populus tremula L.)*. Madrid: Grupo Mundi-Prensa.
- SIGMA-ALDRICH. (2014). Product Information of Murashige and Skoog Basal Medium. *Catalogo number M5519*.
- Smith, R. (2000). *Plant tissue culture: techniques and experiments*. Academic Press.
- Song, S., Sato, T., Ishii, K., Saito, A., & Ohba, K. (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 Colture Cellulari*. Recuperado el 2 de Febrero de 2015, de Facoltà di agraria, Università degli studi della Basilicata.: https://www.unirc.it/documentazione/materiale_didattico/140_2012_316_156_95.pdf
- Teisson, C., & Alvard, D. (1995). A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: temporary immersion. (M. In Terri, R. Cella, & A. Falavigna, Edits.) *Currents issues in plant molecular and cellular biology*, 105-110.
- Trigo, M. (2013). *Manual de cultivo de la paulownia*. Recuperado el 19 de Octubre de 2014, de La enciclopedia más completa.: <http://paulownias.es/paulownia-descripcion.html>
- Vásques, M., & Ulloa, R. (1997). *EcoCiencia*. Recuperado el 14 de Noviembre de 2013, de Estrategia para la Conservación de la Diversidad Biológica en el Sector Forestal del Ecuador: http://www.flacsoandes.org/biblio/shared/biblio_view.php?bibid=6355&tab=opac.

- Venkateswarlu, B., Mukhopadhyay, J., Sreenivason, E., & Kumar, V. (2001). Micropropagation of *Paulownia fortunei* through in vitro axillary shoot proliferation. *Indian Journal of Experimental Biology*, 39(6), 594-599.
- Villalobos, A. (1982). *Tissue culture applied to ornamental species*. Rome, J.
- Wayne, K., & Donald, G. (2004). *Tree crops for marginal farmland*. University of Tennessee.
- Yaicili, O., & Alikamanoglu, S. (2005). The effect of magnetic field on *Paulownia* tissue culture. *Plant Tissue and Organ Culture*, 83(1), 109-114.
- Yenkateswarlu, B., Mukhopadhyay, J., Sreenivasan, E., & Moses, V. (2001). Micropropagation of *Paulownia fortuneii* through in vitro axillary. *Indian Journal of Experimental Biology*, 39, 594-599.
- Zamora, A., & Juárez, D. (2008). *Micropropagación en piña cultivar MD-2*. Managua-Nicaragua: Universidad Nacional Agraria.
- Zayova, E. (2011). *Micropropagation of Paulownia (Paulownia elongata)* (Vol. 48). Bulgaria, Sofia: AgriculturalAcademy.
- Zhao-Hua, Z., Xin-Yu, L., & YaoGao, X. (1986). *Paulownia in China: cultivation and utilization: The Chinese Academy of Forestry staff*. Beijing, China: Asian Network for Biological Sciences and International Development Research Centre.

ANEXOS

Anexo 1: Contaminación de explantes para la fase I de establecimiento *in vitro* de *Paulownia*.



Anexo 2: Medio de cultivo clásico que contiene macro y micronutrientes y vitaminas, (Murashige & Skoog, 1962) citado en (SIGMA-ALDRICH, 2014).

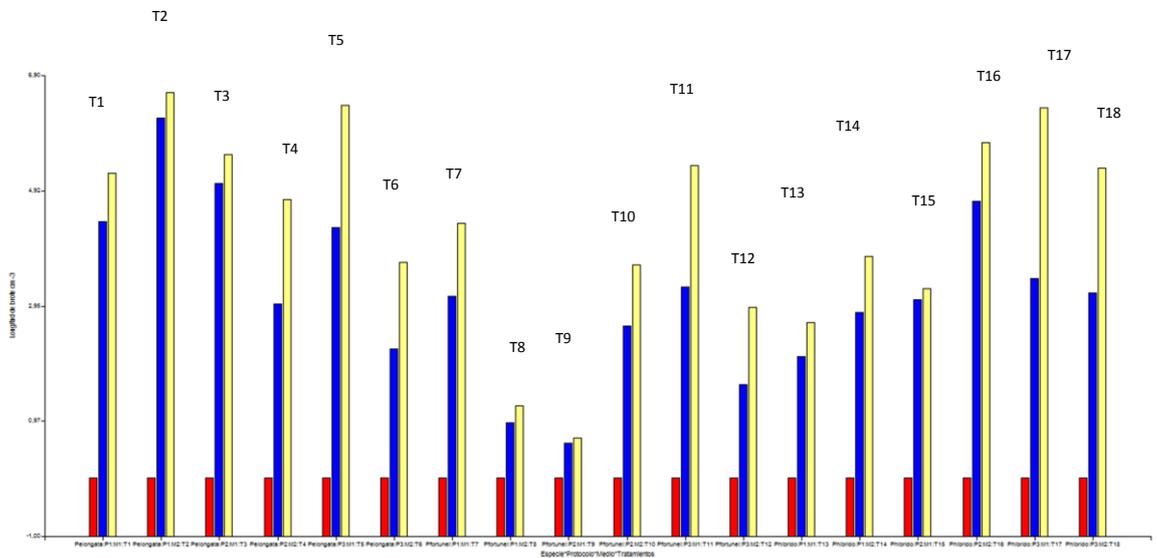
M&S 5519

Components	mg/L
Ammonium nitrate	1,650.0
Boric acid	6.20
Calcium chloride (anhydrous)	332.20
Cobalt chloride hexahydrate	0.0250
Cupric sulfate pentahydrate	0.0250
Disodium EDTA dihydrate	37.260
Ferrous sulfate heptahydrate	27.80
Glycine	2.0
Magnesium sulfate (anhydrous)	180.70
Manganese sulfate monohydrate	16.90
myo-Inositol	100.0
Nicotinic acid	0,50
Potassium iodide	0,830
Potassium nitrate	900.0
Potassium phosphate monobasic	170.0
Pyridoxine hydrochloride	0.50
Sodium molybdate dihydrate	0.250
Thiamine hydrochloride	0.10
Zinc sulfate heptahydrate	8.60

Nota: (SIGMA-ALDRICH, 2014)

Anexo 3: Gráfico de las medias para los 10, 20 y 30 días de longitud de brote para la Fase de establecimiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).

Gráfico en barras de la variable longitud de brotes

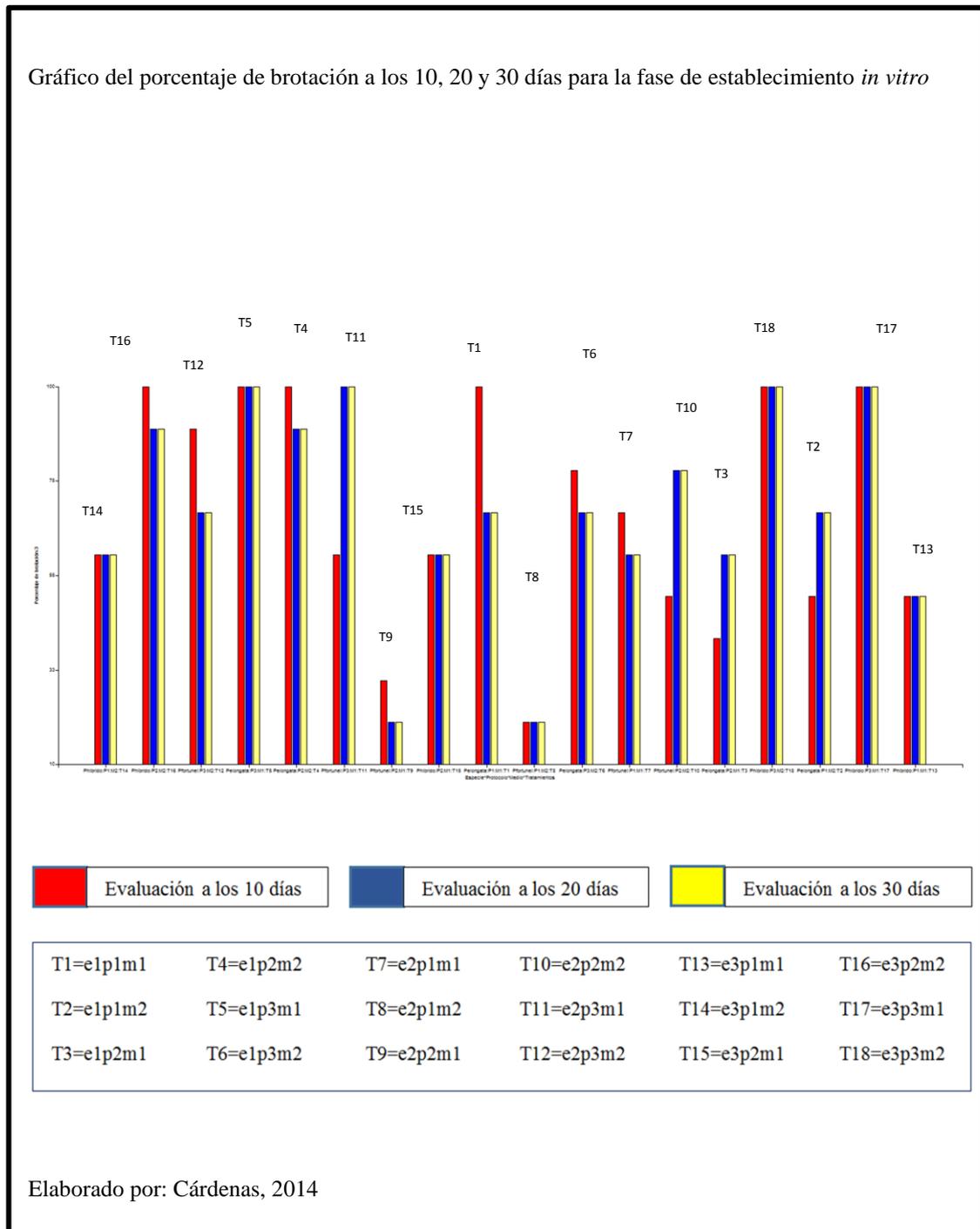


Evaluación a los 10 días
 Evaluación a los 20 días
 Evaluación a los 30 días

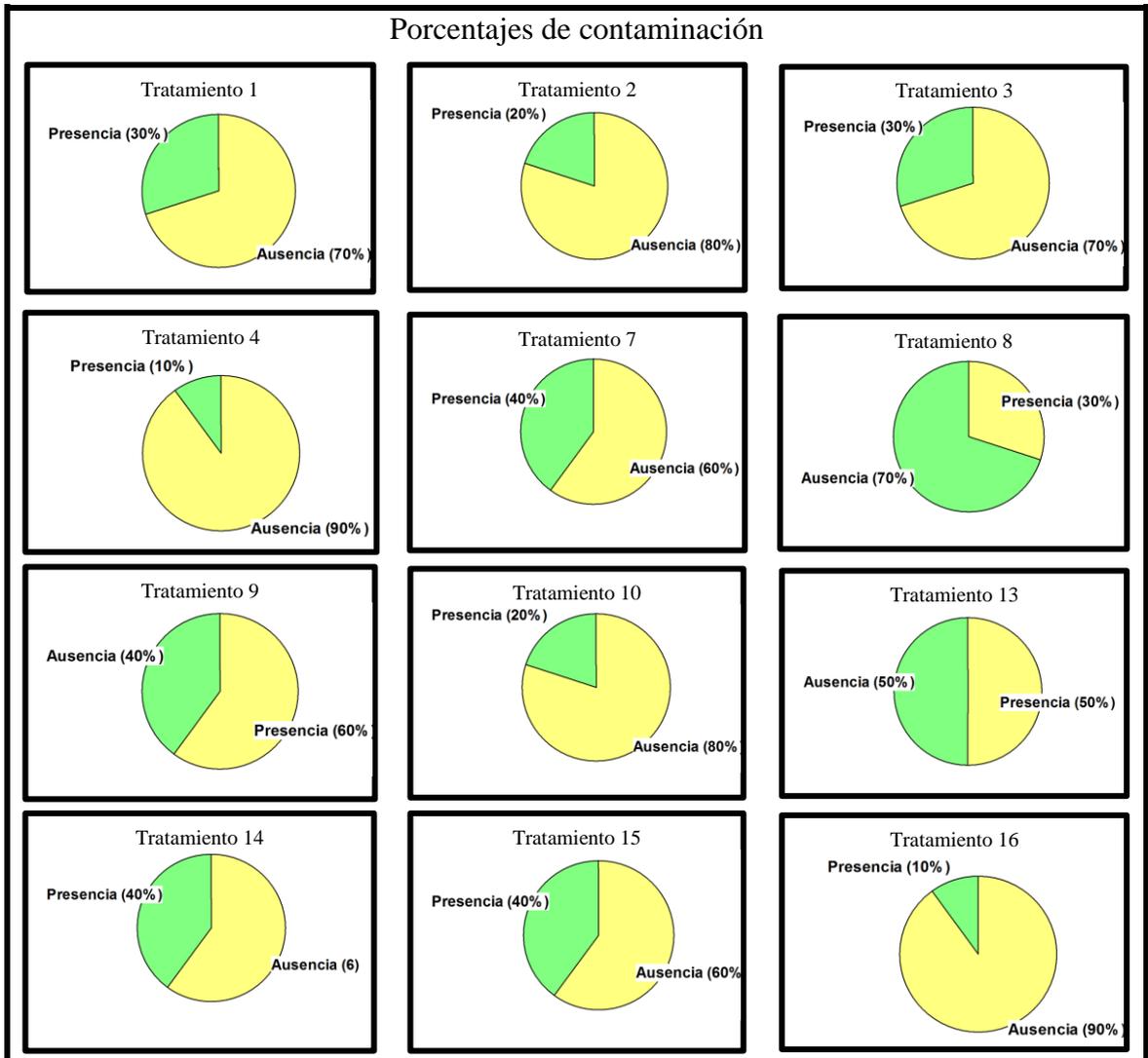
T1=e1p1m1	T4=e1p2m2	T7=e2p1m1	T10=e2p2m2	T13=e3p1m1	T16=e3p2m2
T2=e1p1m2	T5=e1p3m1	T8=e2p1m2	T11=e2p3m1	T14=e3p1m2	T17=e3p3m1
T3=e1p2m1	T6=e1p3m2	T9=e2p2m1	T12=e2p3m2	T15=e3p2m1	T18=e3p3m2

Elaborado por: Cárdenas, 2014

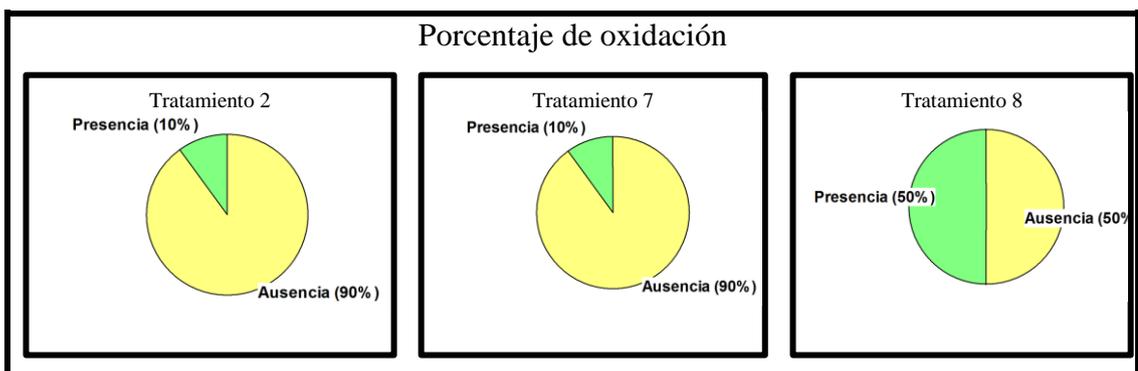
Anexo 4: Gráfico del porcentaje de brotación a los 10, 20 y 30 días para la Fase de establecimiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).



Anexo 5: Porcentaje de contaminación a los 15 días para la Fase de establecimiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).



Anexo 6: Porcentaje de oxidación a los 15 días para la Fase de establecimiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).

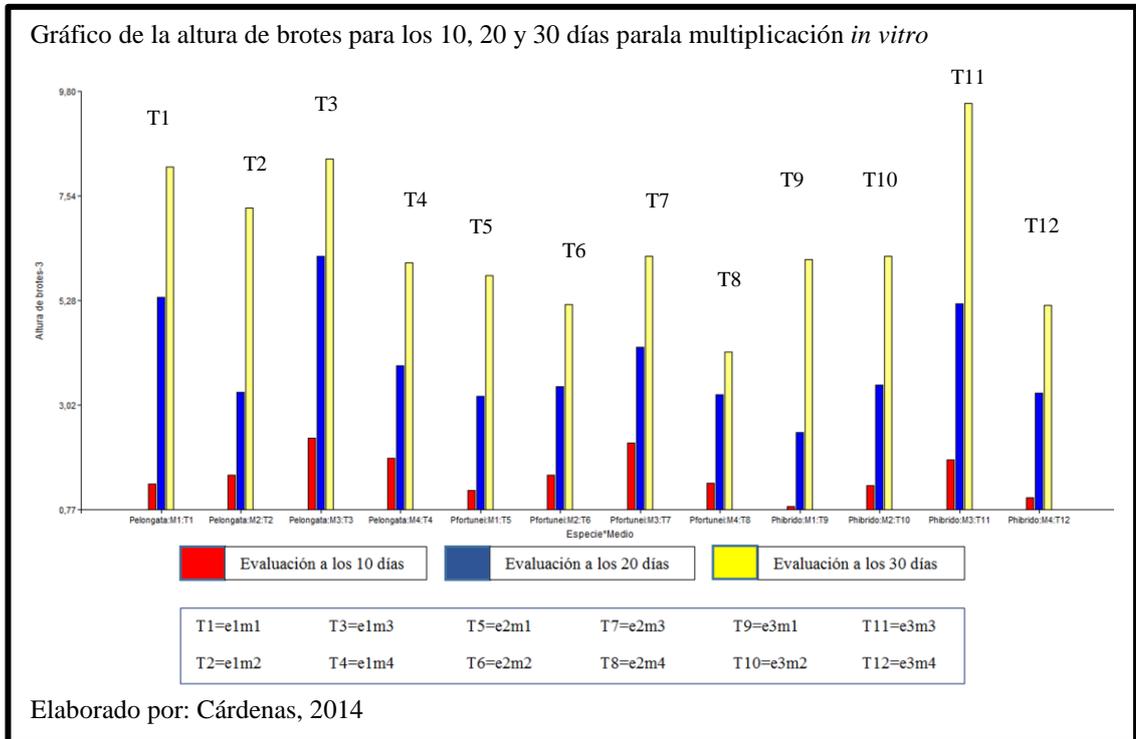


Anexo 7: Fotos de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) para el etapa de establecimiento *in vitro*.

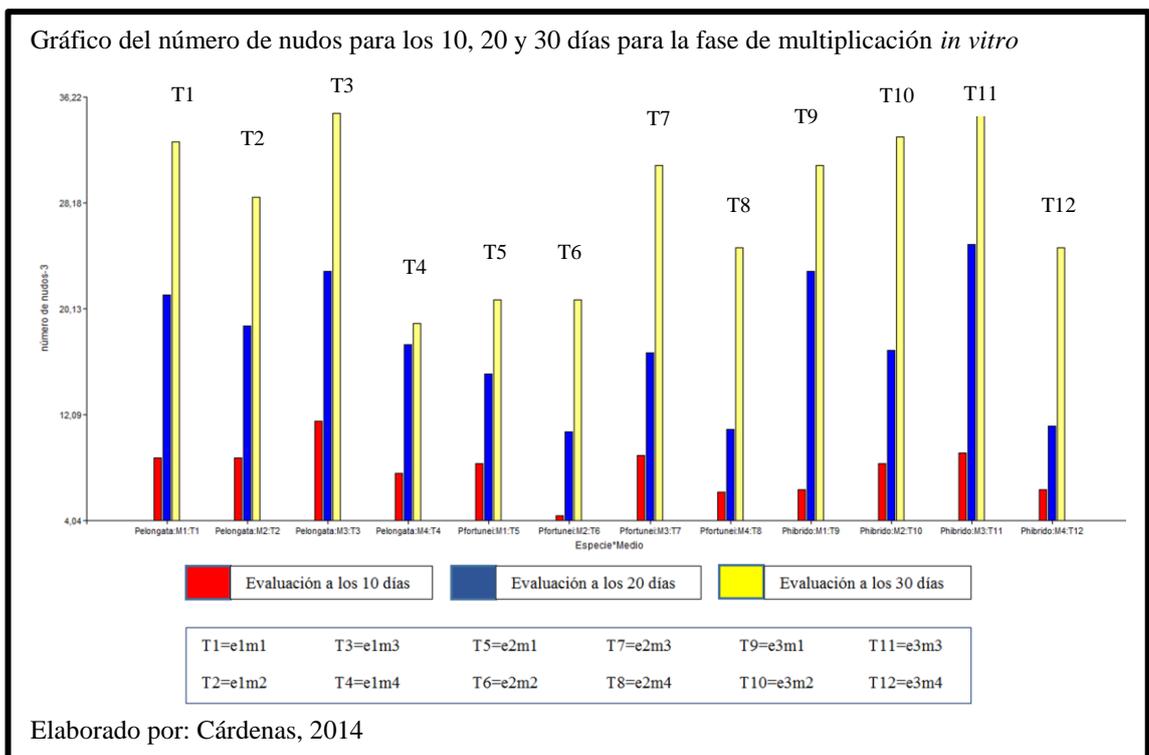
Especie	Foto	
<p><i>P. elongata</i> a los 30 días después de la siembra</p>		
<p><i>P. fortunei</i> a los 30 días después de la siembra</p>		
<p><i>P. híbrido</i> a los 30 días después de la siembra</p>		

Elaborado por Cárdenas, 2014

Anexo 8: Gráfico de la altura de brotes para los 10, 20 y 30 días para la etapa de multiplicación *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) bajo el sistema convencional.



Anexo 9: Gráfico del número de nudos para los 10, 20 y 30 días para la fase de multiplicación *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) bajo el sistema convencional.

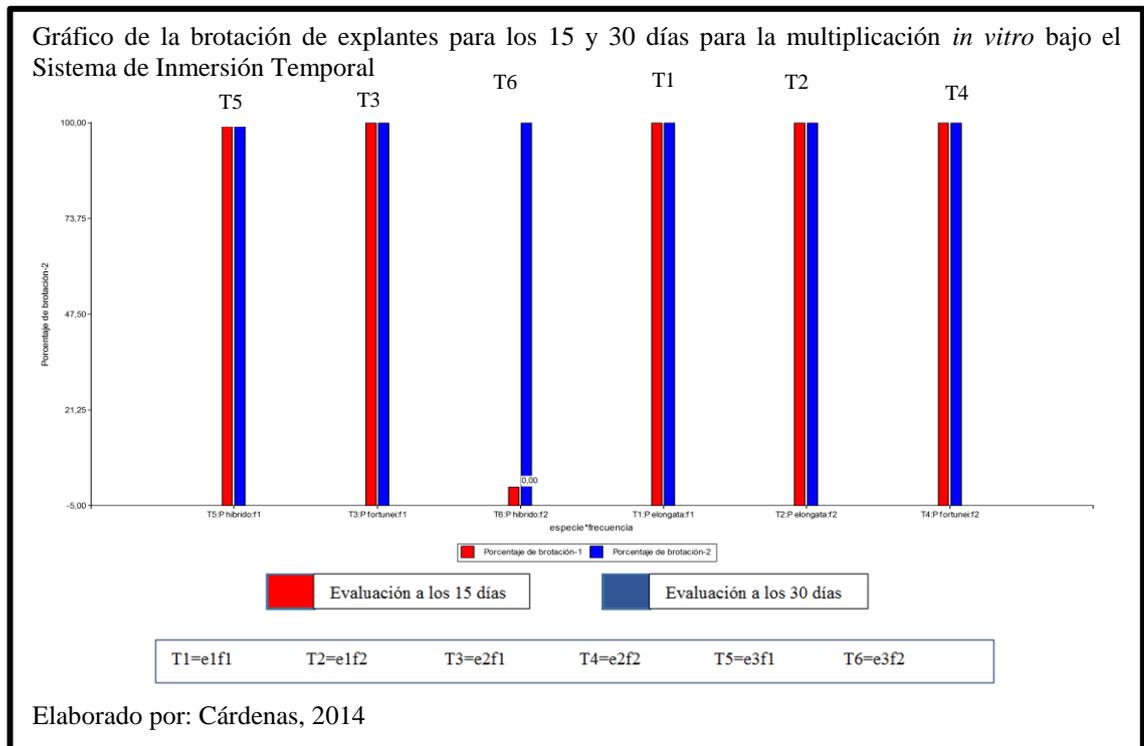


Anexo 10: Fotos de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) para la etapa de multiplicación *in vitro* bajo el sistema convencional.

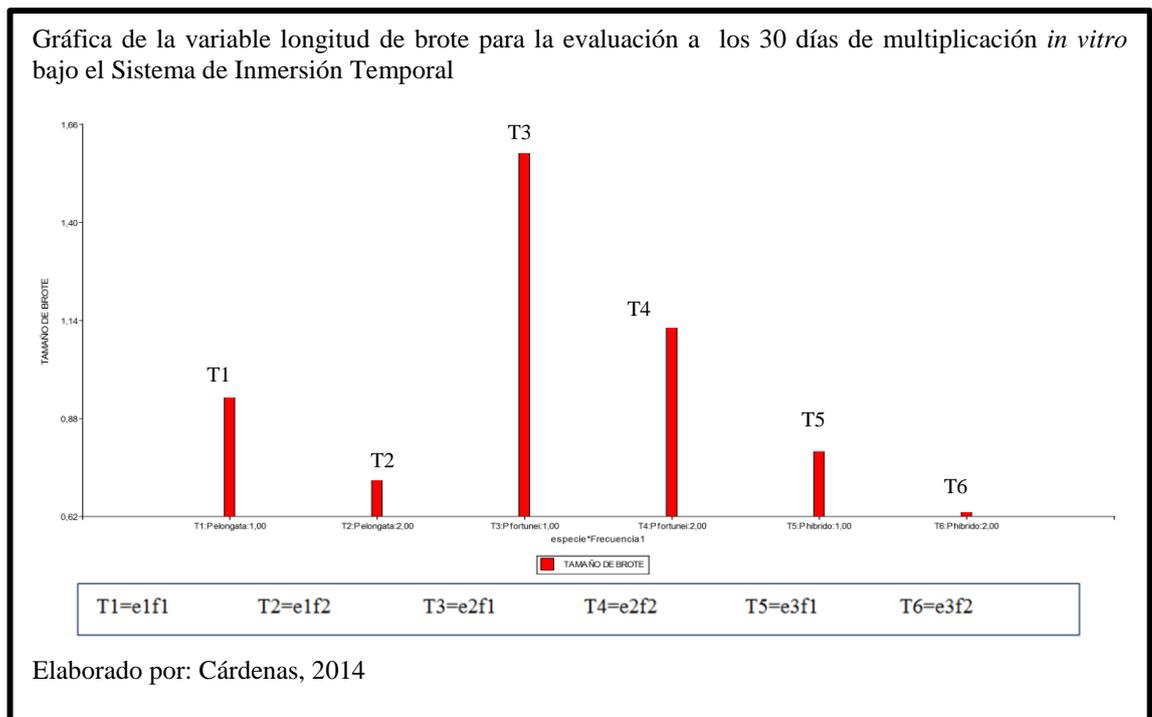
Especie	Foto	
<p><i>P. elongata</i> A los 30 días después de la siembra</p>		
<p><i>P. fortunei</i> A los 30 días después de la siembra</p>		
<p>P. híbrido a los 30 días después de la siembra</p>		

Elaborado por: Cárdenas, 2014

Anexo 11: Gráfico de la brotación de explantes para los 15 y 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) bajo el Sistema de Inmersión Temporal



Anexo 12: Gráfica de la variable longitud de brote para la evaluación a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido bajo el sistema de inmersión temporal.

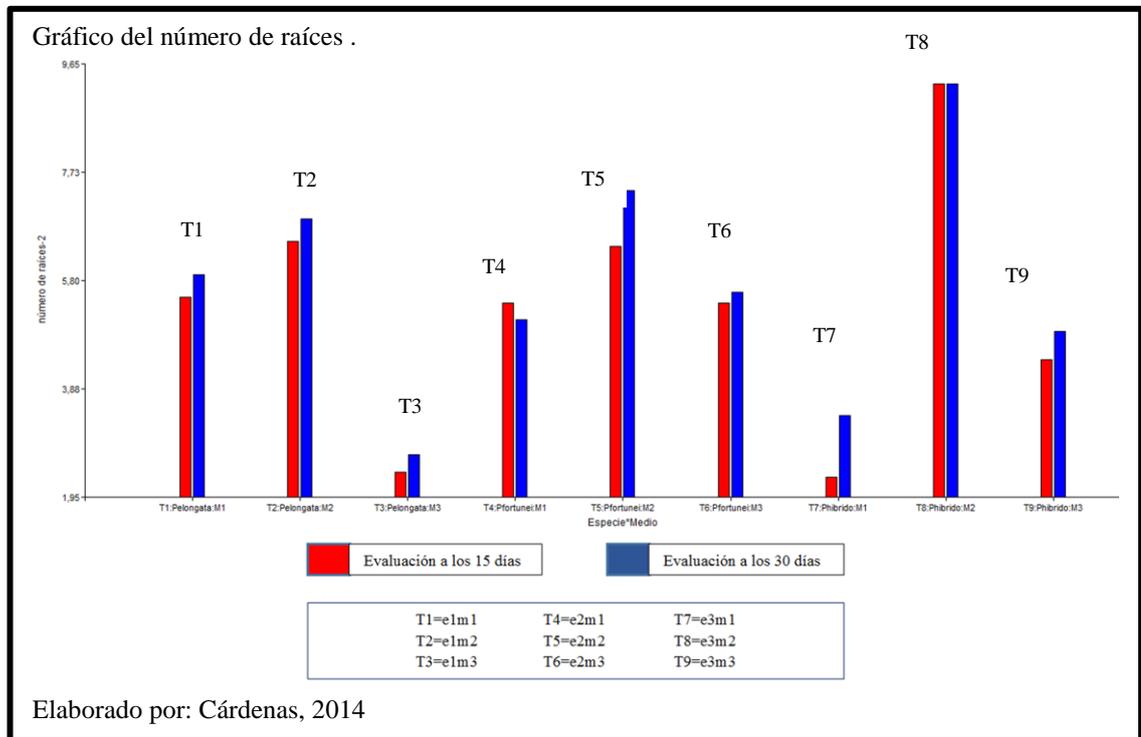


Anexo 13: Fotos de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) para la multiplicación *in vitro* bajo el Sistema de Inmersión Temporal.

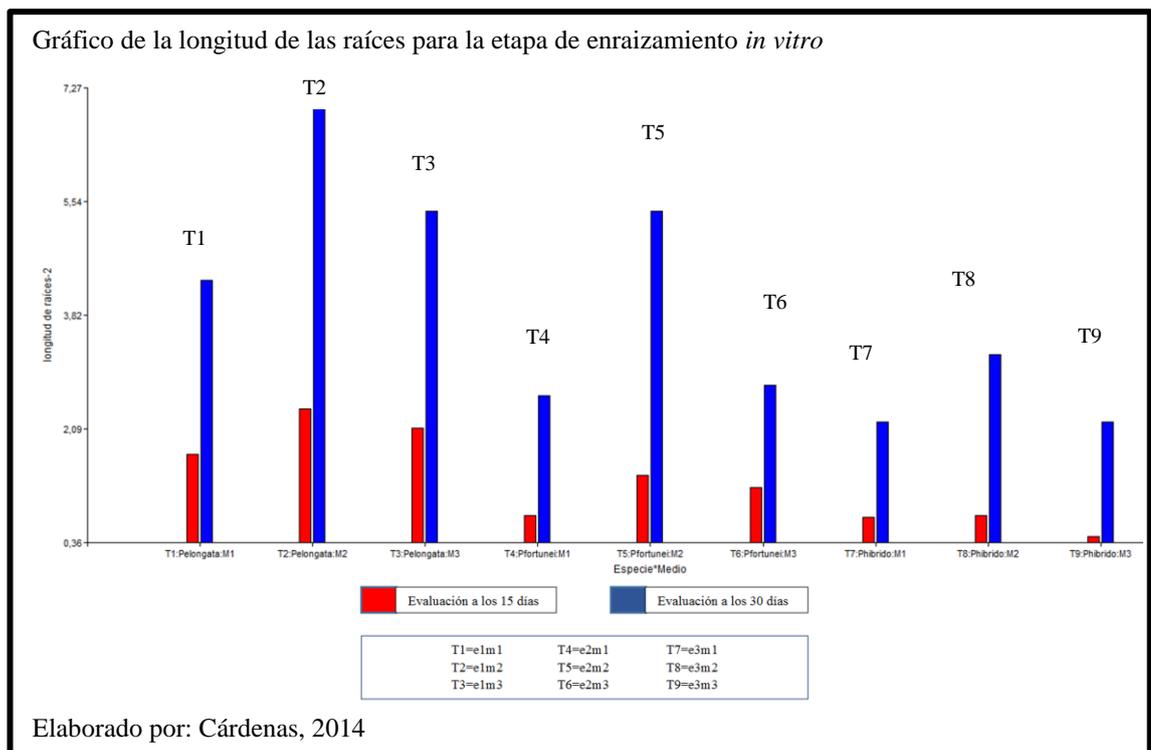
Especie	Foto	
<p><i>P. elongata</i> 30 días después de la siembra</p>		
<p><i>P. fortunei</i> 30 días después de la siembra</p>		
<p>P. híbrido 30 días después de la siembra</p>		

Elaborado por: Cárdenas, 2014

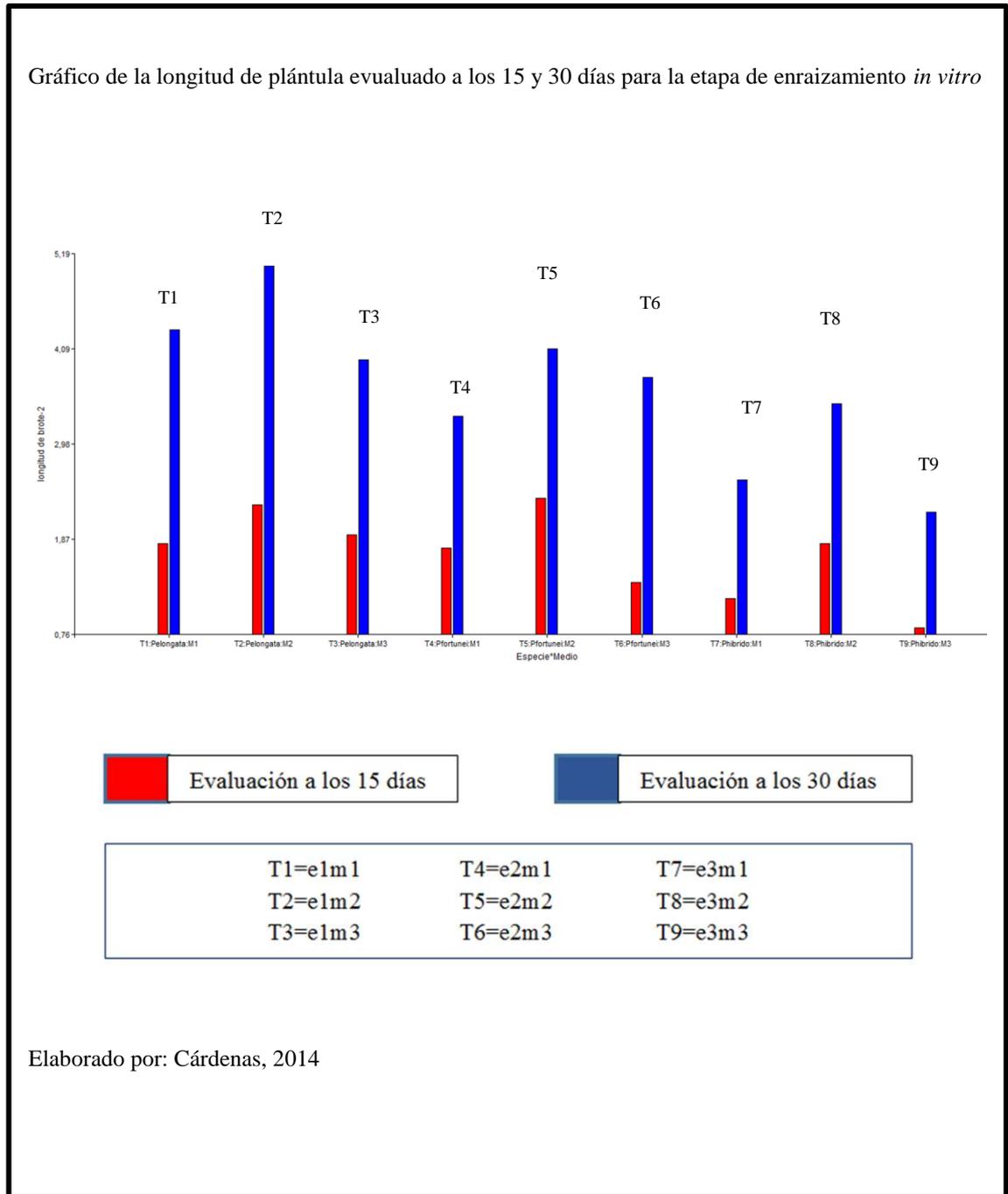
Anexo 14: Gráfica de la variable número de raíces para la evaluación a los 15 y 30 días para la etapa de enraizamiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).



Anexo 15: Gráfica longitud de raíces para la evaluación a los 15 y 30 días para la etapa de enraizamiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).



Anexo 16: Gráfica para la longitud de plántula para la evaluación a los 15 y 30 días para la etapa de enraizamiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).

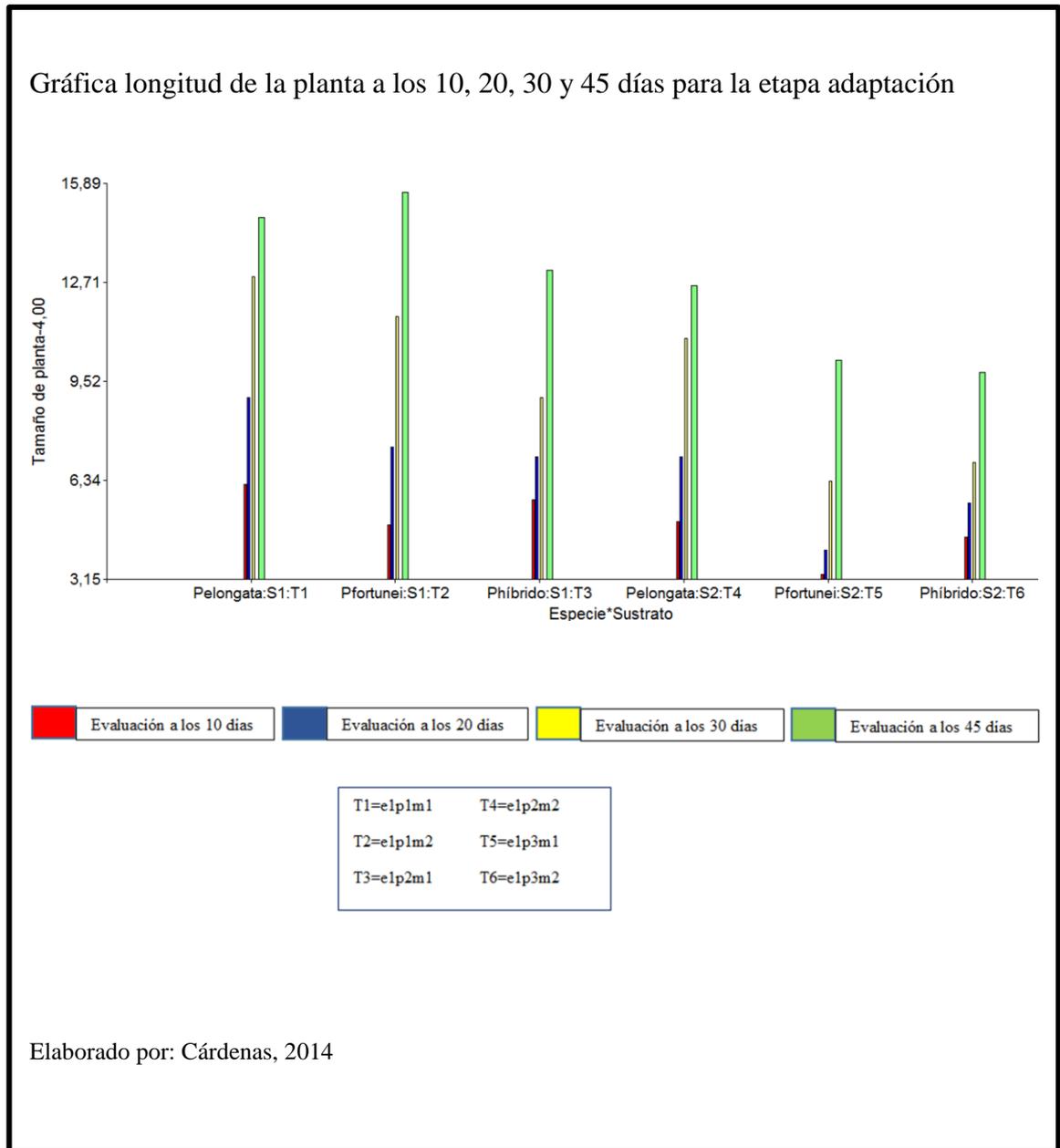


Anexo 17: Fotos de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) para el enraizamiento *in vitro*.

Especie	Foto	
<p><i>P. elongata</i> 30 días después de la siembra</p>		
<p><i>P. fortunei</i> 30 días después de la siembra</p>		
<p>P. híbrido 30 días después de la siembra</p>		

Elaborado por: Cárdenas, 2014

Anexo 18: Gráfica longitud de planta para la evaluación a los 10, 20, 30 y 45 días para la etapa adaptación de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*).



Anexo 19: Fotos de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) para el etapa de adaptación

Especie	Foto	
<p><i>Paulownia elongata</i> 45 días a partir de la siembra</p>		
<p><i>Paulownia fortunei</i> 45 días a partir de la siembra</p>		
<p><i>Paulownia híbrida</i> 45 días a partir de la siembra</p>		

Elaborado por: Cárdenas, 2014

Anexo 20: Glosario de términos

AIA:	Ácido Indol Acético
BAP:	Benzilaminopurina
cm:	centímetro
DCA:	Diseño completamente al azar
g:	gramo
INIAP:	Instituto Nacional Autónomo de Investigación Agropecuaria
L:	litro
mL:	mililitro
M&S:	Medio Murashige y Skoog
msnm:	metros sobre el nivel del mar
NaClO:	Hipoclorito de sodio
ppm:	partes por millón
SENESCYT:	Secretaría Nacional de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación