



PRIMER ENCUENTRO NACIONAL DE BOSQUES, RECURSOS GENÉTICOS FORESTALES Y AGROFORESTERÍA



Memorias del Evento

PROGRAMA NACIONAL DE FORESTERIA

ESTACION EXPERIMENTAL SANTA CATALINA

INSTITUTO NACIONAL AUTONOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

Quito, noviembre de 2013

Editores: Grijalva Olmedo Jorge, Ramos Veintimilla Raúl, Vera Vélez Roy; Barrera Aguilar Paulo; Sigcha Morales Franklin.

Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias

Programa Nacional de Forestería

Panamericana Sur. Km 1. Sector Cutuglahua, Quito-Ecuador

Teléfono: (593) 269 0692

Edición electrónica localizable en las páginas: www.bosquesyagroforesteriainiap.com
www.iniap.gob.ec

Forma de citar este documento: Grijalva, J.; R. Ramos; R. Vera; P. Barrera y F. Sigcha (eds). 2013. Primer Encuentro Nacional de Bosques, Recursos Genéticos Forestales y Agroforestería. Memorias del Evento. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Quito, Ecuador. 318 p.

ISBN: 978-9942-13-642-8



VALIDACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA PROPAGACIÓN MASIVA IN VITRO DE *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) BAJO SISTEMAS DE PROPAGACIÓN CONVENCIONAL E INMERSIÓN TEMPORAL

Cárdenas, A; Grijalva, J; Morillo, E; Ramos, R; Meneses, S

Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Estación Experimental Santa Catalina. Programa Nacional de Forestería. Panamericana Sur Km1, sector Cutuglahua, Quito

angiecard170584@hotmail.com

RESUMEN

Ecuador está experimentando una evolución en la explotación maderera, el promedio de ingresos de las exportaciones en el período 1995 a 2000 fue de US\$ 100 millones, pero el problema radica en que las exportaciones no sobrepasan el 2,2 % y las importaciones el 4,2%, existiendo así un déficit que no cubre el mercado del sector maderero. Por este motivo la introducción de especies de rápido crecimiento como son las del género *Paulownia spp.* es indispensable para abastecer de productos forestales al mercado nacional y para la exportación, para así disminuir la presión sobre bosques naturales. Pero una de las limitantes, es la disponibilidad de material genético homogéneo; nace así la necesidad de implementar herramientas biotecnológicas como la propagación *in vitro* a fin de obtener plántulas iniciales libres de organismos patógenos, homogeneidad del material, mayor vigor de las plantas regeneradas, multiplicación durante todo el año, ahorro de espacio, fácil transporte e intercambio de material vegetal.

Con esta investigación se evaluará bajo las condiciones de los laboratorios en Santa Catalina la propagación *in vitro* convencional mediante organogénesis directa, proponiéndose además evaluar la respuesta bajo biorreactores o Sistemas de Inmersión temporal que es una tecnología alternativa para la multiplicación acelerada de especies vegetales.

Palabras clave: *Paulownia*, propagación *in vitro*, organogénesis directa, sistemas de inmersión, maderable.

INTRODUCCIÓN

Paulownia spp. es el único género con especies arbóreas de la familia *Scrophulariaceae*. Las nueve especies de este género son originarias de China excepto *Paulownia fortunei* y *Paulownia tomentosa*. Específicamente para proyectos forestales, las especies más utilizadas son *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y *Paulownia kawakamii* (Lucas et al., 2011).

Este árbol empezó a ser desarrollado genéticamente, a comienzos de la década de 1990, para que se adaptara a distintos climas a fin de promover su cultivo en el mundo, tanto para reforestación como para uso maderable y energético. Este género se adapta a una gran variedad de climas pues el rango de temperaturas al que pueden adecuarse las especies varía ampliamente, llegando a soportar mínimas absolutas de -20° C y máximas absolutas de 45°C. Algunas experiencias han demostrado que el rango óptimo de temperaturas para el crecimiento en altura y diámetro se localiza usualmente entre 24° C y 29°C de temperatura media diaria.

Paulownia spp. se reproduce a través de semillas y esquejes de tallo y raíz. En cuanto a la primera forma, uno de los principales problemas es que pueden presentar dormancia, además de que el crecimiento de las plántulas es menor que las derivadas de esquejes o multiplicadas *in vitro*. Respecto a la segunda, los

esquejes de tallo, en general, son más difíciles de obtener; no obstante, en los de raíz el daño físico causado a la epidermis y al cortex provoca el ataque de patógenos.

Dentro de las técnicas de cultivo *in vitro* utilizadas en el género *Paulownia* se han reportado la organogénesis directa e indirecta, la embriogénesis somática directa e indirecta, de éstas, la organogénesis directa usando yemas axilares 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.

Existe interés particular en conocer las características y bondades de estas especies de rápido crecimiento para su uso futuro en sistemas de producción agroforestal y en plantaciones forestales en el Ecuador, por lo que la validación y generación de tecnologías *in vitro* para la multiplicación de materiales será de gran utilidad en esta iniciativa del Gobierno Nacional.

JUSTIFICACIÓN

La introducción de especies de rápido crecimiento es indispensable para abastecer de productos forestales al mercado nacional y para la exportación para así disminuir la presión sobre bosques naturales. Debido a las características de *Paulownia*, la Presidencia de la República del Ecuador ha solicitado de manera prioritaria su introducción como alternativa a problemas forestales que tiene el Ecuador ya que se explotan especies nativas e introducidas para cubrir la demanda interna y externa de madera de artesanos, industrial o energía de biomasa, todo esto debido a que en los últimos años el Ecuador está experimentando una evolución en la explotación maderera; es así que según las estadísticas del MAE el promedio de ingresos de las exportaciones en el período 1995 a 2000 fue de alrededor de US\$ 100 millones, pero el problema radica en que las exportaciones no sobrepasan el 2,2 % y las importaciones el 4,2% existiendo así un déficit que no cubre el mercado del sector maderero. Una de las limitantes para el éxito de la introducción de esta especie al Ecuador, es la disponibilidad de material genético homogéneo, libre de enfermedades, debido a que el uso convencional de propagación de dichas especies es por semillas, y estacas. En este ámbito la aplicación de biotecnologías como la propagación *in vitro* permitirá la obtención de plántulas libres de organismos patógenos, homogeneidad del material, mayor vigor de las plantas regeneradas, multiplicación durante todo el año, ahorro de espacio, y fácil transporte e intercambio de material vegetal. La biotecnología permite al sector agrícola y forestal participar en el éxito del sistema productivo aplicando técnicas que consisten en el aislamiento de partes específicas de una planta los cuales son insertados en un medio de cultivo con los nutrimentos hormonales bajo condiciones de asepsia.

OBJETIVO

Validar varios protocolos de propagación *in vitro* realizadas para las especies pertenecientes al género *Paulownia spp.* para establecer la mejor metodología y poder implementar en programas de producción de plantas para la reforestación.

METODOLOGÍA

El estudio se realizará en cuatro fases:

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

Se recolectará explantes de ramas jóvenes con nudos a partir de plantas madre que se encontrarán en el invernadero. Los explantes recolectados se colocarán inmediatamente en agua, para su posterior lavado con jabón líquido y abundante agua para eliminar posibles contaminantes. Luego se someterán a una desinfección con alcohol al 70%, hipoclorito de sodio y fungicidas para proceder a su introducción a diferentes medios de cultivo.

Entre las variables que se evaluarán consta:

- *Porcentaje de brotación*

Esta variable se evaluará con observaciones a los 10, 20, 30 días y se determinará el crecimiento de los brotes a partir de la siembra.

- *Porcentaje de contaminación*

Se determinará el porcentaje de contaminación con observaciones frecuentes de las muestras a partir de la siembra hasta los 15 días después de la siembra. Se registrará los explantes contaminados de acuerdo a la fórmula:

$$\% \text{Contaminación} = \frac{\text{explantes contaminados}}{\text{total de explantes}} \times 100$$

- *Porcentaje de oxidación*

Se contabilizará los explantes que presentaron oxidación a partir del primer día de siembra.

- *Tasa total de pérdida*

Se contabilizará el número de explantes contaminados, número de explantes muertos que presento a los 15 días a partir de la siembra se utilizará la siguiente formula:

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

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.

Se prepararán diferentes medios de cultivo con reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones entre ellas BAP y ANA, y se probarán bajo los dos sistemas de propagación masiva.

Entre las variables que se evaluarán para el sistema convencional serán:

- *Altura de los brotes*

La evaluación se realizará a los 10, 20 y 30 días a partir de la siembra, se registrará los datos en mm con la ayuda de una regla milimetrada.

- *Número de nudos*

Se contabilizará el número de nudos que presentará cada uno de los explantes a partir de la siembra a los 10, 20 y 30 días.

- *Índice de multiplicación*

El índice de multiplicación se evaluará a los 10, 20 y 30 días, posteriores a la siembra, se obtendrá contando el número de nudos obtenidos cada mes dividido para el número de plantas, para lo cual se utilizará la siguiente fórmula:

$$IM = \frac{\text{Número de nudos a los 30,60 y 90 días}}{\text{Número de plantas evaluadas}}$$

- *Tasa de pérdida*

Se contabilizará el número de explantes contaminados, número de explantes muertos a partir de la siembra hasta los 10, 20 y 30 días para lo cual se utilizará la siguiente fórmula:

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

Entre las variables que se evaluarán para los sistemas de inmersión temporal serán:

Por observación visual, se registrará la brotación de los explantes a los 15 y 30 días a partir de la siembra.

- *Tamaño de brotes*

Se determinará la longitud en centímetros de los brotes y se obtendrá un promedio de la longitud de brotes por cada tratamiento a los 30 días a partir de la siembra.

- *Porcentaje de brotes hiperhidratados*

Se establecerá mediante relación porcentual entre el número brotes con hiperhidratación y el número total de brotes. Se evaluará a los 30 días.

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

- *Índice de multiplicación*

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

$$\text{Índice de multiplicación} = (\text{n}^\circ \text{ explantes} * \text{n}^\circ \text{ nudos}) / \text{n}^\circ \text{ de explantes iniciales}$$

Fase III: Enraizamiento *in vitro* de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*), en medio sólido de explantes provenientes de la segunda fase.

Se prepararán diferentes medios de cultivo con reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones entre ellas IBA y ANA.

Entre las variables que se evaluarán para el sistema convencional serán:

- **Número de plántulas con raíces**

Se contabilizará el número de plántulas que desarrollen raíces a los 15 y 30 días de haber sido sembrado el brote en medio enraizante

- **Número de raíces**

Se contará el número de raíces de cada brote, a los 15 y 30 días de haber sido sembrados.

- **Longitud de las raíces**

Se determinará la longitud de la raíz principal a los 15 y 30 días haber sido sembrado el brote en medio enraizante. Se utilizará una regla milimetrada, y la medida se expresará en milímetros (mm).

Fase IV: Adaptación a condiciones de invernadero de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y un híbrido (*Paulownia fortunei* x *Paulownia elongata*) obtenidas *in vitro*.

Se colocarán las plántulas en diferentes sustratos como son la turba y la pomina, y se evaluarán por observación visual, se registrará la sobrevivencia de las plantas a los 10, 20 y 30 días a partir de la siembra en invernadero. Se calificará de acuerdo a la siguiente escala, donde, 1 corresponderá a las plantas vivas y 0 a las plantas muertas.

RESULTADOS ESPERADOS

Se espera obtener un porcentaje mínimo del 86% de brotación aplicando los tratamientos de cada protocolo que se evaluará en cada etapa de experimentación, bajo el sistema convencional e inmersión temporal empleando como tejido ideal los segmentos internodales según la bibliografía consultada.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, M., Villalobos, A., Salgado, R. 2001. Cultivo *in vitro* de Paulonia (*Paulownia tomentosa*). Revista Mexicana de ciencias forestales. 19 p. Consultado 5 de sep.2013. Disponible en: <http://agroforestal.com.mx/content/cultivo-vitro-de-paulonia>

Bergmann, B., and Moon, H. 1997. *In vitro* adventitious shoot production in *Paulownia*. Plant Cell Rep. 16(5):315-318. Consultado 13 sep. 2013. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007%2F01088288#page-1>

Castellanos, O., Rodríguez, A., Rodríguez, J., Rodríguez, B. 2006. Organogénesis indirecta y enraizamiento *in vitro* de *Paulownia elongata*. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. 4(15):13. Consultado 9 sep. 2013. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/730/73000415.pdf>.

Corredoira, E., Cernadas, J., San José M. 2010. Inducción de yemas adventicias en *Paulownia tomentosa* estudio anatómico del proceso caulogénico. Santiago de Compostela, España. Revista Real Academia Galega de Ciencias 29: 5-22. Consultado 15 sep.2013. Disponible en: <http://www.raqc.cesga.es/RRAGC/revista2010/pdf/Inducciondeyemas.pdf>.

Grijalva, J., X. Checa, R. Ramos, P. Barrera y R. Limongi. 2012. Situación de los Recursos Genéticos Forestales – Informe País Ecuador. Preparado por el Programa Nacional de Forestería del INIAP con aval del INIAP/FAO/MAE/MAGAP/MMRREE. Documento sometido a la Comisión Forestal de la FAO-Roma, para preparación del Primer Informe sobre el Estado de los Recursos Genéticos Forestales en el Mundo. 95 p.

Ipecki, Z., Gozukirmizi, N. 2004. Indirect somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and internodal explants of *Paulownia elongata*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 79(3):341-345.

MAE. 2011. Estimación de la Tasa de Deforestación del Ecuador continental. Disponible en:http://www.ambiente.gob.ec/sites/default/files/users/mponce/TasasDeforestacionEcuador.Ver_03.05.11.pdf.

Zhao-Hua, Z., X. YaoGuo y L. Xin-Yu, 1986. *Paulownia* in China; cultivation and utilization. The Chinese Academy of Forestry. Asian Development for Biological Science and International Development Research Centre, Beijing, China.