



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS

**Propagación *in vitro* vía organogénesis
de *Morus alba* L. variedad Criolla**

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas

Autor: Ing. José Enrique Salas Barboza. MSc.
Tutor: Inv. Titular. Ing. Daniel Agramonte Peñalver. Dr.C.

Santa Clara
2010

SÍNTESIS

La morera (*Morus alba* L.) , constituye una de las especies con mayores perspectivas de expansión para la alimentación animal por sus elevados rendimientos en biomasa comestible, digestibilidad, palatabilidad, altos valores nutricionales, perennidad frente al corte, su uso como forraje verde y la posibilidad de conservarla en forma de ensilaje o deshidratada. Sin embargo, debido a la problemática que presenta la propagación de morera por estacas y semilla botánica, el cultivo *in vitro* puede ser una alternativa. El presente trabajo se realizó con la finalidad de propagar *in vitro* *Morus alba* L. variedad Criolla vía organogénesis. Se definieron los medios y condiciones de cultivo para el establecimiento *in vitro* de morera a partir de plantas de campo, se multiplicaron las plantas *in vitro* en medio de cultivo semisólido y Sistemas de Inmersión Temporal y se caracterizaron morfológicamente las plantas *in vitro* de morera en casa de cultivo y campo así como se determinó su estabilidad genética. Los resultados demostraron que fue posible establecer yemas apicales de morera tanto en medio de cultivo semisólido como líquido con un 86,7% de explantes viables al utilizar hipoclorito de sodio al 1% durante 15 minutos. Además, se logró 89,8% de yemas brotadas, un promedio de 3,14 brotes por explante y 4,99 cm de longitud de los brotes, adicionando al medio de cultivo líquido 0,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP. La mejor respuesta en la multiplicación de las yemas axilares se logró al añadir al medio de cultivo 0,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP y 0,5 mg.L⁻¹ de ANA, con un coeficiente de multiplicación de 9,51 en medio de cultivo semisólido y 15,5 en inmersión temporal. En la fase de aclimatización, el mejor tratamiento fue con 85% humus de lombriz y 15% de zeolita, en las variables supervivencia, altura de la planta, número de hojas, masa fresca y masa seca de las plantas obtenidas en Sistemas de Inmersión temporal. En condiciones de campo, las plantas procedentes del cultivo *in vitro* fueron superiores en altura, número de hojas, número de ramas, área foliar y producción de biomasa foliar respecto a las de estacas. Por otro lado, no se observaron diferencias en la forma, color, superficie, textura y margen de las hojas de las plantas obtenidas mediante el cultivo *in vitro* respecto a las de estacas. Con el empleo de marcadores ISTR y de acuerdo con el coeficiente de similaridad y la heterocigocidad esperada, no se observó variabilidad genética entre las plantas *in vitro* y las de estacas. A partir de los resultados de este trabajo se estableció un protocolo para la propagación *in vitro* de morera.

1. INTRODUCCIÓN

Las especies forrajeras herbáceas son la principal fuente de alimentación del ganado en los trópicos, pero su bajo contenido de nutrientes es la mayor limitante para cubrir los requerimientos nutricionales de los animales y hacer más rentable la ganadería. Por esta razón es importante buscar alternativas que permitan mejorar la calidad nutricional de estos forrajes, disminuir los costos por suplementación alimenticia y consecuentemente aumentar la productividad animal (Harizanis, 2007; Milera y col., 2007).

Una de estas alternativas es el uso de los árboles y arbustos forrajeros, los cuales han alcanzado un notable auge en los últimos diez años debido a los beneficios productivos, económicos, sociales y ambientales que brindan (Benavides, 2002; Martin y col., 2007). Dentro de estas especies forrajeras, se encuentra la morera (*Morus alba* L.), la cual despierta cada vez más interés de especialistas y productores encargados de promover vías de producción y explotación sostenibles, lo más independiente posible de insumos externos y con las respuestas productivas que necesita la creciente demanda de los productos básicos de la canasta familiar (Jaramillo, 2006; Srivastava y col., 2006).

La morera, constituye una de las especies con mayores perspectivas de expansión para estos fines, por sus elevados rendimientos en biomasa comestible, digestibilidad, palatabilidad, altos valores nutricionales, perennidad frente al corte, su uso como forraje verde y la posibilidad de conservarla en forma de ensilaje o deshidratada (Todaro y col., 2007; Martin y col., 2007; Kabi y Bareeba, 2008).

El cultivo de esta especie se inició hace 5000 años con el objetivo de alimentar o cubrir los requerimientos nutricionales del gusano de seda (*Bombix mori* L.) y no fue hasta finales de los años 80 del siglo pasado cuando se iniciaron las investigaciones y su utilización como alimento animal en América Latina y el Caribe, debido a sus excelentes características como forraje (Sánchez, 2002a; Martin y col., 2007).

Entre los países que han desarrollado estudios sobre la morera, como alimento animal, se encuentran: Japón, México, India, República de Tanzania, Kenia, Vietnam, Costa Rica, Colombia, El Salvador, Guatemala, Brasil y Cuba (Xuan y Duc, 2003; Kandylis y col., 2009).

En el último de ellos, es donde se ha investigado la morera más activamente en aspectos agronómicos, diferentes modalidades de cosecha, conservación de forraje y experimentos con animales, en diversas variedades como son: Criolla, Acorazonada, Tigreada e Indonesia. Entre ellas, sobresale la variedad Criolla por su capacidad de producción de biomasa con valores de 2,86 kg.planta⁻¹.año⁻¹ y hasta 14,1 ton.ha⁻¹ de masa seca y alto valor nutricional con un contenido de proteínas entre 25 y 27%. En la mayoría de los estudios se señalan como los factores que más influyen en estas variables, en el género *Morus*, la densidad de siembra, la fertilización y la frecuencia de corte. No obstante, se mencionan otros factores como son: la época de corte, el riego, la densidad de plantación, y la edad de la planta (García y col., 2006; Martín y col., 2007; Milera y col., 2007; Milera y col., 2010).

En México, la morera se ha utilizado para la alimentación de ovinos, caprinos, bovinos y monogástricos. Dadas las características que posee como planta forrajera, entre las que se destacan el potencial de producción de biomasa, el alto contenido de proteína y la elevada digestibilidad de la materia seca, representa una alternativa para la alimentación animal. Sin embargo, existe poca disponibilidad de material vegetal para plantación con el método de propagación por estacas que comúnmente se ha utilizado. Además, existe una demanda potencial de alrededor de ocho millones de posturas (si se considera una densidad de plantación de 1,0x0,5 m de distancia entre surcos y plantas), ya que 400 mil hectáreas se dedican a la actividad ganadera en la zona tropical, lo que hace evidente la necesidad de material de plantación (Hernández y col., 2004; Sánchez, 2006; García y col., 2009a).

La propagación de esta especie es a través de estacas o de semilla botánica, lo que constituye un factor limitante para su expansión territorial (Dandin y Naik, 2004; Henríquez, 2004; Pelicano y col., 2007). La propagación por semilla botánica es la menos recomendada y utilizada, debido a la heterogeneidad propia del método, como resultado de la polinización cruzada (Anis y col., 2003; Gnanam, 2004; García y col., 2009).

Por lo tanto, la propagación por estacas es la que se utiliza con mayor frecuencia, sobre todo porque garantiza una mayor homogeneidad de las plantaciones. Sin embargo, tiene la desventaja, que dependiendo de la manipulación (sobre todo el tiempo entre el corte y la

plantación), el genotipo, el estado fisiológico de la planta donante y los factores ambientales incidentes; la supervivencia de las estacas no sobrepasa el 40%. Además, la producción de estacas se restringe a pocos meses del año debido al ciclo de crecimiento de la planta y depende del manejo y lugar de plantación (Hassanein y *col.*, 2003; Tikader y Kamble, 2008; Balakrishnan y *col.*, 2009).

El sistema de propagación por estacas tiene, además, como inconvenientes, que el material de plantación (tallos) es también utilizado para la alimentación animal, lo cual reduce aún más su disponibilidad (Singh y Makkar, 2002; Henríquez, 2004), tiene altos costos de mano de obra y lento desarrollo de las plantas, ya que se requiere de alrededor de un año, desde el momento del establecimiento en el campo, hasta su utilización como material de plantación (Benavides, 2002; Sánchez, 2002a,b; Pelicano y *col.*, 2007).

Adicionalmente, este método de propagación es destructivo, por lo que es difícil cubrir la demanda de material para plantación, tanto en investigación como para producción (Sánchez, 2002b; Henríquez, 2004; Moreno y *col.*, 2005; Obrador y *col.*, 2007).

Debido a la problemática que presenta la propagación de la morera por estacas y semilla botánica, una alternativa es la propagación *in vitro*, ya que es un método más rápido para la producción de grandes cantidades de plantas homogéneas en un período de tiempo relativamente corto. El cultivo *in vitro* asegura la producción de plantas *in vitro* de la especie vegetal todo el año, con altas tasas de multiplicación y puede ser utilizada en la producción a nivel comercial (Vijayan y Padmaja, 2002; Anis y *col.*, 2003; Hassanein y *col.*, 2003; Gnanam, 2004).

Con este método se han logrado algunos resultados en el establecimiento y multiplicación de varias especies de *Morus* tales como: *M. alba* L., *M. australis* Poir., *M. bombycis* Koidz., *M. cathyana* Hemsl., *M. latifolia* Poilet., *M. laevigata* Wall., *M. indica* L. y *M. nigra* L., en las cuales la principal vía de multiplicación empleada ha sido a través de yemas axilares en medio de cultivo semisólido, con: N₆ bencilaminopurina (6-BAP), kinetina (Kin), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), ácido

indolacético (AIA) y ácido giberélico (AG₃) (Pattnaik y Chand, 2000; Vijayan y Padmaja, 2002; Lu, 2002; Habib y col., 2003; Hassanein y col., 2003).

Sin embargo, en la literatura científica consultada, a pesar de que existen resultados en la propagación *in vitro* de *Morus alba* L., sólo se refieren hasta la fase de enraizamiento (Vijayan y Padmaja, 2005; Balakrishnan y col., 2009) y no se encontraron resultados de investigaciones en *Morus alba* L. variedad Criolla.

La necesidad de mejorar la producción animal y las características como planta forrajera, hacen de la morera una especie de gran importancia, tanto para la investigación, como para la producción. Sin embargo, es preciso el desarrollo de métodos más avanzados y eficientes de propagación.

Considerando lo expuesto anteriormente, se estableció la siguiente hipótesis de trabajo: **“Si se logra el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de *Morus alba* L. variedad Criolla, en medio de cultivo semisólido y Sistemas de Inmersión Temporal, a partir de plantas de campo, es posible establecer un protocolo para su propagación *in vitro*”.**

Para dar cumplimiento a la hipótesis planteada se proponen los siguientes objetivos:

1. Definir los medios y condiciones de cultivo para el establecimiento *in vitro* de morera a partir de plantas de campo
2. Multiplicar plantas *in vitro* de morera en medio de cultivo semisólido y sistemas de inmersión temporal
3. Caracterizar morfológicamente las plantas *in vitro* de morera en casa de cultivo y campo, y determinar la estabilidad genética de éstas.

Novedad científica

Se refiere por primera vez:

- el empleo de Sistemas de Inmersión Temporal para la multiplicación *in vitro* de plantas del género *Morus*.
- el estudio comparativo en la fase de aclimatización y en campo de poblaciones de plantas de *Morus* procedentes de estacas y del cultivo *in vitro*,

- el empleo de marcadores moleculares ISTR para determinar la estabilidad genética de plantas *in vitro* de *Morus* respecto a las plantas obtenidas de estacas.
- la propagación *in vitro* de *Morus alba* L. variedad Criolla en medio de cultivo líquido y semisólido.

Aporte metodológico

Se establece un protocolo para la propagación *in vitro* de *Morus alba* L. variedad Criolla, en medio de cultivo semisólido y sistemas de inmersión temporal hasta la evaluación de las plantas *in vitro* en condiciones de aclimatización y campo.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características botánicas de morera

La morera pertenece al reino *Plantae*, subreino *Tracheobionta*, división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida*, subclase *Hamamelidae*, orden *Urticales*, familia *Moraceae*, subfamilia *Moroideae*, grupo *Morae*, género *Morus* y su forraje ha sido tradicionalmente utilizado para alimentar el gusano de seda desde hace 5 000 años principalmente en los países asiáticos donde existe un amplio germoplasma de este género (Yongkang, 2002).

La familia de *Moraceae* comprende especies laticíferas, generalmente leñosas, distribuidas sobre todo en los países tropicales. Las *Moraceae* están dominadas por árboles y arbustos con hojas alternas y estípulas concrecentes. Las flores son unisexuales, sobre plantas dioicas, actinomorfas, haploclamídeas, con perigonio simple y sepaloide, con tépalos y estambres en número variable, y el gineceo constituido por dos carpelos soldados en un ovario unilocular, raramente bilocular, y por norma general súpero. La familia está convencionalmente dividida en dos secciones: a) *Moroideae*, a la que pertenece el género *Morus*, con inflorescencias masculinas y femeninas en amentos. Los tépalos del perigonio en la madurez se vuelven carnosos y participan en la formación de una particular inflorescencia, la mora, cuyo verdadero fruto son las núculas, que están envueltas por el perianto carnosos y b) *Arctocarpeae*, a la que pertenece el género más rico, *Ficus*, con 700 especies, presente con la higuera (*Ficus carica* L.). La característica fundamental de este grupo es su particular inflorescencia, el sicono, de forma esférica o piriforme, con las flores colocadas en la cavidad interna, después de la fecundación el sicono se transforma en una infrutescencia con los verdaderos frutos (pequeñas núculas) en el interior (Dirr, 1990; Datta, 2002).

Morus alba L. es un arbusto que alcanza mayor altura que *Morus nigra* L., con la corteza grisácea, copa redondeada y abiertamente ramificada. Las hojas son ovadas u orbicular-ovadas, con ápice agudo o cortamente acuminado. La base es semitruncada u oblicua. El borde es dentado o irregularmente lobulado. Son de consistencia blanda, lo que las diferencia de las de *Morus nigra* L. Tienen el haz lampiño y el envés ligeramente

tomentoso en las axilas de los nervios principales. Flores en amentos de color crema o verdosos, estando las flores femeninas y masculinas en los mismos pies o en pies separados (monoicas o dioicas). Fruto de color blanco, blanco-rosado, rojo o morado, más insípido que el de *Morus nigra* L. y normalmente de menor tamaño y en menor cantidad. La mayoría de las especies del género *Morus* y las variedades cultivadas son diploides sin embargo, las triploides, tetraploides, pentaploides y hexaploides también se cultivan debido a su adaptabilidad, crecimiento vigoroso y calidad de hojas (Macchi y col., 2002; Moreno y col., 2002).

Existen aproximadamente 68 especies del género *Morus* y la mayoría de ellas se encuentran en Asia (Datta, 2002). En China existen más de mil variedades bajo cultivo originadas de cuatro especies principales: la morera Blanca (*Morus alba* L.), la morera de Lu (*M. multicaulis*), la morera Montañesa (*M. bombycis*) y la Morera de Guangdong (*M. atropurpurea*) (Yongkang, 2002).

En la India las principales especies son *M. indica*, *M. alba*, *M. serrata* y *M. laevigata* que crecen naturalmente en el norte del país (Ravindran y col., 1997); sin embargo, las variedades que más se cultivan provienen de *M. indica* o *M. alba* (Sastry, 1984). De acuerdo con Sánchez (2002a), se cree que las especies más populares en el mundo provienen de *Morus alba* L. y *Morus indica* L. las cuales han sido sujeto de selección intensiva a través de la polinización abierta, selección e hibridación controlada, mejoramiento por mutaciones en varios países, lo que ha resultado en más de mil variedades, incluyendo muchos poliploides.

2.2. Importancia de la morera como especie cultivada

A finales de los años 80 e inicios de los 90 el cultivo de la morera como forraje se expandió considerablemente en América Latina, América Central y el Caribe debido principalmente a la necesidad de material vegetal para experimentación de las Instituciones de investigación (Benavides y col., 1994). Es por ello, que en Cuba se llevaron a cabo investigaciones más activas en morera como alimento animal, incluyendo

aspectos agronómicos, diversas modalidades de cosecha, conservación de forraje y experimentos con animales. Otros países donde se han realizado investigaciones en esta especie como alimento animal son República de Tanzania, Kenia, Costa Rica, Colombia, México, El Salvador, Guatemala y Brasil (Sánchez, 2002a).

En Cuba, de acuerdo con Martín y col., (2002) se establecieron las primeras plantas de morera en los años cuarenta del siglo XX con el objetivo de alimentar al gusano de seda y posteriormente se expandió su cultivo en varias regiones del país. Por otro lado, Vargas y col., (2002), Leiva y col., (2004) y Martín, (2004), indicaron la existencia en cultivo de cuatro variedades de *Morus alba* L. (Tigreada, Acorazonada, Criolla, Indonesia) y una de *Morus nigra* L. (Bety), con el propósito de alimentar animales domésticos como: terneros, aves de corral, cameros, cerdos y conejos.

La aplicación más importante que ha tenido esta especie a nivel mundial ha sido para producir gusano de seda el cual se alimenta exclusivamente de las hojas. El país que más superficie tiene dedicada al cultivo de la morera es China con alrededor de 626 000 hectáreas, luego se encuentra la India con cerca de 280 000 ha, Tailandia y Brasil con 38 000 ha y otros países que cultivan la morera en menor escala (Sánchez, 2002a).

Se han desarrollado diversos proyectos para producir gusano de seda en varios países de África y Latinoamérica con el objetivo de introducir y diseminar las variedades de morera en condiciones ambientales y de suelo diferentes, sin embargo con los diversos problemas y limitaciones que presenta la industria de la seda, la morera se ha evaluado también con propósitos medicinales, producción de madera, como leña, barrera rompevientos, cerca viva, sombra, producción de fruta, paisajismo y para la alimentación de animales domésticos (Zepeda, 1991; Macchi y col., 2002; Talamucci y col., 2002).

En los países tropicales existen muchas especies de árboles y arbustos con buenas características forrajeras debido al alto contenido de nutrientes del follaje y capacidad para producir elevadas cantidades de biomasa por unidad de área (Benavides, 1991; Reed, 1994). Por esto, la utilización del follaje de morera puede ayudar a disminuir la

dependencia de piensos importados para la alimentación del ganado (Romero y col., 1994).

El uso de follaje de árboles y arbustos en la alimentación de rumiantes es una práctica muy usada por los productores desde hace siglos y el conocimiento empírico sobre las propiedades forrajeras de diferentes especies es de gran valor para la ciencia y la tecnología. La meta de los trabajos de investigación realizados es desarrollar tecnologías de producción agroforestal que sean competitivas con los sistemas de producción tradicionales basados en el uso de alimentos concentrados de alto costo y que al mismo tiempo sean compatibles con el medio ambiente y propicien la sostenibilidad de la producción. Uno de los ejemplos de mayor éxito, tanto a nivel de investigación como de adopción, por parte de productores e investigadores es la morera (Benavides, 1995).

Con su introducción en varios países, la morera ha sido seleccionada y mejorada por calidad y rendimiento de hojas en muchos ambientes, sus hojas son muy palatables y digeribles (70-90%) para los rumiantes, pero también pueden ser consumidas por monogástricos y pequeñas especies. El contenido de proteínas de las hojas y tallos tiernos, con un excelente perfil de aminoácidos esenciales, varía entre 15 y 28% dependiendo de la variedad, edad de la planta y las condiciones de crecimiento (Espinoza, 1996; Trigueros y Villalta, 1997; González y col., 1998). El contenido mineral es alto y no se han identificado hasta ahora compuestos tóxicos o principios antinutricionales. La cosecha se puede hacer arrancando las hojas o cortando ramas o la planta entera (Sánchez, 2002b).

De acuerdo con Machii (1989) los aminoácidos esenciales contenidos en las hojas de morera son más del 46% de los aminoácidos totales y los 204,3 mg de aminoácidos por gramo de proteína son equivalentes a 3,47% de nitrógeno, lo que significa el 80% del total de nitrógeno. La enzima más importante, como en la mayoría de las hojas, es la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (RuBisCO), cuyo sitio activo es responsable por la fijación de carbono (Kellogg y Juliano, 1997). El nitrógeno en RuBisCO puede representar el 43% del total de nitrógeno de la morera (Yamashita y Ohsawa, 1990).

Shayo (1997) menciona contenidos de lignina de 8,1 y 7,1% para las hojas y corteza respectivamente. Una característica sorprendente en la morera, es su alto contenido de minerales con valores de cenizas de un 17%. Los contenidos típicos de calcio son de 1,8 a 2,4% y de fósforo de 0,14 a 0,24%. Espinoza (1996) encontraron valores de potasio de 1,90 a 2,87% en las hojas y de 1,33 a 1,53% en los tallos tiernos, asimismo contenidos de magnesio de 0,47 a 0,64% en hojas y 0,26 a 0,35% en tallos tiernos.

Es sorprendente que una planta que ha sido utilizada y mejorada para alimentar a un animal con requerimientos nutricionales elevados, el gusano de seda, haya recibido atención limitada por ganaderos, técnicos e investigadores pecuarios. Existen lugares donde el follaje de morera se usa tradicionalmente en la alimentación de rumiantes, como en ciertas partes de la India, China y Afganistán, pero fue solo en los años 80 del siglo XX que empezó el interés en su cultivo intensivo y uso en la alimentación de animales domésticos (Benavides, 2002).

Existe una gran variación en la producción de hojas y en su calidad entre las especies y variedades de morera cultivadas en diferentes localidades y bajo condiciones diversas de suelo y medio ambiente, lo que demuestra el gran potencial para identificar el germoplasma apropiado para cada sitio o sistemas de producción (Yonkang, 2002).

El rendimiento de biomasa y la proporción de hojas varía con la especie, la variedad, el clima (precipitación y radiación solar), la fertilidad del suelo y la densidad de siembra (Gong y col., 1995; González y col., 1998; Ye, 2002). Al respecto Espinoza (1996) indicó una producción de 6,5 a 45,2 ton.ha⁻¹.año⁻¹ de masa seca fertilizando el cultivo con 180 y 360 kg.ha⁻¹.año⁻¹ de nitrógeno respectivamente, de la cual del 25 a 32% se correspondió con la producción de hoja. A su vez Shayo (1997) menciona un rendimiento total y de hoja de 50,4 y 16,9 ton.ha⁻¹.año⁻¹ de masa seca respectivamente y Boschini (2002) observó una producción de materia seca en hoja de 19,5 ton.ha⁻¹.año⁻¹ de masa seca.

2.3. Cultivo convencional de la morera

La morera es una planta "cosmopolita" por su gran capacidad de adaptación a diferentes

climas y altitudes. En varios países se utiliza para proporcionar sombra, como planta ornamental y para controlar la erosión (Viera y col., 1998; Martín y col., 2000). Se desarrolla bajo diversas condiciones ambientales que van desde el clima templado al tropical. El rango ideal de temperatura es de 24 a 28°C, la precipitación media anual de 600 a 2 500 mm; en promedio, la morera requiere de 340 m³.ha⁻¹ de agua cada diez días en el caso de suelos arcilloso-limosos y de 15 días en arcillo-arenosos. La humedad relativa ideal es entre 65 y 80%. El fotoperiodo es uno de los factores importantes que controlan el crecimiento y calidad de las hojas, por ello, la morera requiere de 9 a 13 horas de luz por día. Los suelos deben ser planos, profundos, fértiles, bien drenados, arcillosos y porosos con pH óptimo de 6,5 a 6,8. (FAO, 1990; Datta, 2002).

La densidad de siembra en lugares planos es de 45 cm entre plantas y 1,0 m entre surcos, lo que significa 22 000 plantas.ha⁻¹ (Benavides, 1995). Uribe (2002) recomienda densidades de siembra que van de 25 a 32 000 plantas.ha⁻¹ asegurando la aplicación de 50 kg de fosfato de calcio y 400 g de materia orgánica por planta al momento de la siembra. En zonas húmedas o con riego, se puede sembrar durante todo el año. El primer corte puede efectuarse 12 meses después de establecida la plantación y si la fertilización es adecuada puede ser cada tres meses (Oviedo y col., 1994; Benavides, 1995).

Existen varios factores naturales y de manejo que afectan la productividad de la morera, como el tipo de suelo y las condiciones climáticas, modo de propagación y técnica de cosecha. En general, los intervalos largos entre defoliaciones aumentan el rendimiento total, del cual la mayor proporción es de tallo no comestible y con ello disminuye la calidad de forraje (Ivory, 1990; Shelton y Brewbaker, 1994). Por otro lado, al disminuir el espacio entre plantas el rendimiento por planta disminuye debido a la intensa competencia que existe entre ellas, pero el rendimiento de forraje total se incrementa (Ella y col., 1989).

Aunque el rendimiento de biomasa se incrementa durante el año, la cantidad y valor nutritivo de los componentes comestibles disminuye considerablemente debido a la senescencia y caída de hojas, como lo mencionan Tikader y col., (1993) quienes

obtuvieron el máximo valor en esta variable cosechando al final de la época de lluvias y mediados de la época seca.

El follaje de esta planta posee un alto valor nutricional, llegando a alcanzar valores de proteína bruta superiores al 25% con digestibilidad por encima del 80%. Su rango de adaptación es muy amplio, encontrándose desde el nivel del mar hasta 4 000 m de altura. Es exigente a la fertilización por tener una gran capacidad de extraer nutrientes del suelo para producir altos rendimientos de follaje. Por las características nutricionales y su capacidad de producir altos volúmenes de biomasa, se considera una planta de gran potencialidad forrajera en el trópico (Jegou y *col.*, 1994; Espinoza, 1996; Benavides, 2000).

2.3.1. Métodos de propagación

El método más común de propagación en la morera es por medio de estacas plantadas en forma directa, la longitud de éstas no debe exceder de 25 a 40 cm de largo y con no menos de tres yemas tomadas de ramas lignificadas (diámetro >2 cm). Deben enterrarse a 3,0 ó 4,0 cm de profundidad y, si el suelo no es muy compacto, no es preciso preparar el terreno antes de la siembra, siendo sólo necesario eliminar la vegetación. Las estacas no rebrotan al mismo tiempo; varía entre 4 y 35 días la aparición de las primeras hojas. En buenas condiciones de manejo las estacas pueden alcanzar más del 90% de rebrote. Este método de propagación permite que las variedades e híbridos existentes o futuras plantas mejoradas sean inmediatamente incorporadas a los sistemas de producción (Velázquez y *col.*, 1994; Benavides, 1995; Sanginés y *col.*, 1999; Uribe, 2002). Sin embargo, en la propagación de plantas, cualquiera que sea el método empleado, no se puede prescindir de un control de la calidad el cual debe abarcar aspectos patológicos, genéticos y fisiológicos. La propagación por vía vegetativa con el empleo de los métodos tradicionales, posee el riesgo de transmitir infecciones virales u otros agentes patógenos. En ciertos lugares se prefiere la siembra por semilla, la cual probablemente asegura un sistema radicular más profundo con mayor capacidad para encontrar agua y nutrientes,

que se reflejará en mayor productividad y más larga longevidad. Las semillas pueden también ser la manera más barata y aceptable para transportar, cuarentenar y almacenar germoplasma. Sin embargo, las ventajas de la propagación vegetativa (por estacas) son la garantía de las características productivas, la facilidad de obtención de material y la facilidad de siembra (Benavides, 2002; Sánchez, 2002b).

Esta especie vegetal se puede plantar tanto en suelos planos como en pendientes, pero no tolera suelos de mal drenaje o muy compactos y tiene altos requerimientos nutricionales por lo que su fertilización permanentemente es necesaria. Las estacas, pueden guardarse por más de una semana a la sombra y por más de 100 días en cámara fría sin afectar la capacidad de enraizamiento. No se necesita preparar el terreno, ni corregir la acidez del suelo para su establecimiento en campo (Oviedo y col., 1994).

Una vez obtenidas las estacas, puede recurrirse a la siembra directa o a la siembra por trasplante. La siembra directa tiene sus ventajas y desventajas en cuanto a rapidez, costos, preparación del terreno, resiembra y menor resistencia en ciertas épocas. Sin embargo, la siembra por trasplante (tratamiento previo con auxinas) es la más utilizada porque es una forma fácil y rápida de conservar las características de las plantas madres. Es recomendable la selección y preparación del material vegetal, ubicación de los enraizadores, siembra de las estacas y la siembra en sitio definitivo (Henríquez, 2004).

El empleo de los métodos de propagación de la morera varían en cada región. En China, la semilla, injertos y estacas son todos usados, aunque recomiendan la propagación de plantas híbridos F1, debido a que se aseguran las características de las plantas donadoras como el rápido crecimiento y elevado rendimiento de biomasa. Mediante semilla, se utilizan 15 kilogramos por hectárea; sembrada en suelo fértil con una capa de paja de arroz (*Oriza sativa* L.), riego y buen drenaje y sin la presencia de enfermedades e insectos, con ello se logra una tasa de germinación de 80 a 85% y una supervivencia de 40 a 50%, cuando los brotes desarrollan las dos primeras hojas verdadera (10 días después) se elimina la paja y se proporciona al suelo una solución entre 0,3 a 0,5% de

urea cada cinco a siete días para alcanzar una altura de las plantas de 30 cm a los 90 días y entre 60 a 100 cm de altura entre 120 a 150 días (Yongkang, 2002).

En la India se emplean tres métodos de propagación los cuales dependen de la disponibilidad de agua: a). Bajo condiciones de lluvia, el método de propagación de la morera es mediante estacas, las cuales deben tener 50 mm de diámetro y 22 a 25 cm de largo con cinco o seis yemas, se siembran directamente en suelo bien preparado dejando una sola yema expuesta sobre la superficie del suelo, sembradas en forma triangular con una distancia entre estacas de 15 cm; b). Bajo condiciones de riego, la propagación de la morera se lleva a cabo por estacas e injertos. Las estacas deben tener 15 mm de diámetro y entre 15 a 18 cm de largo con tres o cuatro yemas. Realizan la siembra en campo y dejan una sola yema sobre la superficie del suelo. Seis meses después de la siembra las plantas alcanzan entre 1,5 a 1,75 m de altura a la cual están listas para ser cosechadas; c). En las Colinas indias, no se realiza la siembra directa de las estacas, en cambio se siembran plantas de cinco meses de edad con cinco o seis raíces sujetas a un palo tutor para asegurar su crecimiento (Datta, 2002).

En Japón, la propagación de la morera es generalmente por injerto y estacas. El injerto en la raíz es el más utilizado debido a que es más fácil de realizar y los brotes tienen una tasa de supervivencia alta. Las variedades con pobre desarrollo radicular se tratan con reguladores de crecimiento previo al desarrollo del injerto (Machii y col., 2002). En Italia, se introdujeron plantas de *Morus alba* L. entre 1930 y 1950 para la alimentación del gusano de seda, desde entonces su propagación ha sido por estacas de variedades seleccionadas (Cappelozza, 2002).

En Costa Rica, de acuerdo con Boschini, (2002), la propagación de la morera se lleva a cabo principalmente mediante estacas de 1,0 a 2,0 cm de diámetro y 40 cm de largo y con al menos tres yemas presentes, enterrando en el suelo entre 5,0 a 8,0 cm de la estaca. En Colombia, Uribe (2002) señala que la morera se propaga asexualmente mediante estacas con 15 a 20 cm de largo y entre 18 a 20 mm de diámetro, establece además, que las estacas deben ser de tallos maduros (más de tres meses de edad) y seleccionar las

estacas del centro del tallo. Estas estacas se siembran inicialmente en suelo cubierto por un plástico para evitar la pérdida de humedad y presencia de enfermedades en donde permanecen durante 45 días y posteriormente se trasplantan en campo.

En Camboya, Moreno y *col.*, (2002) indican que el principal método de propagación de la morera es por estacas, a las cuales se les elimina la corteza de la parte inferior para acelerar la aparición de los brotes.

En Cuba, de acuerdo con Martín y *col.*, (1998; 2000 y 2002) la propagación convencional de la morera se lleva a cabo mediante estacas, con una longitud entre 25 a 40 cm, con mínimo tres yemas presentes y activas, un diámetro mayor a los 2,0 cm y enterrando entre 3,0 a 4,0 cm. De forma similar se lleva a cabo en México (Sanginés y *col.*, 1999).

A pesar de las ventajas que presenta el método de propagación por estacas, se requiere de otras alternativas para la propagación masiva de la morera entre las que se encuentra el cultivo *in vitro*.

2.4. Propagación *in vitro*

El cultivo de tejidos está modificando las técnicas convencionales de reproducción y propagación de plantas y aporta múltiples ventajas en su uso, ya que las plantas propagadas muestran un desarrollo uniforme que implica una reducción del tiempo de cosecha así como un incremento en el vigor el cual se expresa a través del crecimiento más rápido y aumento en los rendimientos con respecto a los métodos convencionales (Jiménez, 1992).

Según Mroginski y Roca (1993), Kitto (1997) y Orellana (1998) entre las ventajas más importantes de este método de propagación cuando se compara con los convencionales están: los altos coeficientes de multiplicación que permiten manipular volúmenes elevados de plantas en cortos períodos de tiempo, la rápida introducción de nuevas variedades o clones, la reducción del tiempo de multiplicación, la producción independiente de las condiciones ambientales, el incremento en los rendimientos debido al rejuvenecimiento y

saneamiento, la uniformidad en las plantaciones producidas y mejor facilidad para la comercialización.

La organogénesis es un evento morfogénico y ha sido la base fundamental de la multiplicación vegetativa, dentro de ésta pueden diferenciarse dos vías: la formación de yemas axilares y adventicias (Jiménez, 1998a). En el caso de los trabajos realizados en cultivo de tejidos de morera todos ellos utilizan la primera de ellas (Sahoo y col., 1993; Chakraborti y col., 1998; Sanginés y col., 1999; Takao, 2000; Vijayan y Padmaja, 2002; García y col., 2002).

La formación de yemas axilares se basa en el desarrollo de brotes a partir de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas o primordios de hojas los cuales son divididos y subcultivados repetidamente. Estos subcultivos traen consigo un incremento del coeficiente de multiplicación. Además, por esta vía se reducen las anomalías o variaciones en el genotipo de las plántulas propagadas *in vitro* (Jiménez 1998a; Orellana, 1998).

La inducción de yemas axilares produce el menor número de plántulas y depende del número de yemas plantadas en cada cultivo, sin embargo se garantiza una menor tendencia a inducir variabilidad genética (Quintero, 1996). Este método a pesar de no ser el más rápido es el más utilizado en la propagación comercial debido a la estabilidad genética de las plantas y a la facilidad con que se ha establecido en la mayoría de las especies (Jiménez, 1998a).

A nivel internacional son pocos los estudios biotecnológicos en *Morus alba* L. en relación con otros cultivos de interés agrícola y de pricultura. Estos se concentran en los trabajos realizados por Sanginés y col., (1999); Pattnaik y Chand (2000); Bhau y Wakhlu (2001); Vijayan y Padmaja (2002) y Hassanein y col., (2003), quienes evaluaron esta especie con el objetivo de propagarla masivamente, debido a la escasez de material vegetal y la necesidad de incrementar la producción de biomasa para la alimentación del gusano de seda.

Por otro lado, no se encontró trabajo alguno en la literatura consultada sobre la aplicación

del cultivo de tejidos en *Morus alba* L. variedad Criolla que es la variedad más importante y difundida tanto en Cuba como en México debido a su alto contenido de proteína, digestibilidad superior y elevada capacidad de producción de biomasa las cuales la hacen una especie vegetal forrajera que se puede utilizar en la alimentación animal (Martín y col., 2002; Sánchez, 2002b).

Para iniciar el cultivo *in vitro* de una especie vegetal es necesario primero seleccionar la parte de la planta más apropiada para ese fin, aunque se puede evaluar cualquier tipo de material vegetal, en general resulta más conveniente utilizar los órganos, tejidos o células de plantas jóvenes que los de plantas adultas. Es por ello que Sanginés y col., (1999), plantearon que la morera puede ser establecida y multiplicada *in vitro* a partir de peciolo y hojas, sin embargo Vijayan y Padmaja (2002), Habib y col., (2003) y Hassanein y col., (2003) lograron su multiplicación con yemas axilares. Por su parte, Susheelamma y col., (1996) y Lu (2002) lo hicieron a través de segmentos nodales.

Por otro lado, es más fácil iniciar y establecer los cultivos *in vitro* a partir de plantas herbáceas que de plantas leñosas debido al más lento crecimiento y presencia de microorganismos contaminantes (hongos y bacterias principalmente) en éstas últimas. Por esta razón, en esta especie vegetal, al iniciar el proceso de propagación *in vitro* se han utilizado diferentes agentes de desinfección como son: bicloruro de mercurio, hipoclorito de sodio y etanol, entre otros (Sahoo y col., 1993; Pattnaik y col., 1995; Sahoo y col., 1997; García y col., 2002 y Habib y col., 2003).

Como regla general, se ha observado que los requerimientos nutricionales y de reguladores de crecimiento son mayores cuanto menor es el tamaño de la parte de la planta que se va a cultivar (Ochoa, 1990). Las yemas o brotes son más fáciles de cultivar que las células individuales, por ello en el cultivo *in vitro* de morera estos son el tipo de explantes que generalmente se utilizan (Vijayan y Padmaja, 2002).

De todos los componentes del medio de cultivo, los reguladores de crecimiento son sin lugar a dudas los compuestos que más influyen sobre el crecimiento y la diferenciación de las células y tejidos cultivados *in vitro* (Orellana, 1998; Panhwar, 2005). Generalmente, las

combinaciones apropiadas de las auxinas y citoquininas en el medio de cultivo pueden promover el desarrollo de órganos cultivados *in vitro* o pueden inducir diferentes procesos morfogénicos, esto es, la formación de estructuras organizadas de novo a partir de los tejidos o células (Dixon, 1994; Jiménez, 1998a). De la combinación apropiada de reguladores de crecimiento se pueden regenerar yemas o brotes que se pueden transferir a medios de cultivo específicos que induzcan la formación de raíces para regenerar plantas completas (Krikorian, 1993; Jiménez, 1998a). En este sentido, Sahoo y col., (1997) observaron que al adicionar $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP y $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA en el medio de cultivo MS se logró la proliferación de brotes de morera (*Morus indica* L).

Los cultivos *in vitro* generalmente se mantienen en cuartos o cámaras de crecimiento con condiciones controladas de luz y temperatura. El tipo de luz, la intensidad y las horas de exposición a ella, tienen un importante efecto sobre la morfogénesis en los cultivos, por lo que es conveniente establecer las necesidades específicas para cada sistema (Mroginski y Roca, 1993; Pierik, 1994; Panhwar, 2005). Al respecto, Lu (2002) utilizó tres intensidades de luz 40, 80 y $140 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para observar su efecto en la altura de los brotes y número de hojas en morera (*Morus latifolia* Poilet) y observó que el empleo de 80 ó $140 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ le proporcionaron los mejores resultados en las variables estudiadas. Sin embargo, Hassanein y col., (2003) y Habib y col. (2003) lograron multiplicar los explantes de morera (*Morus alba* L.) manteniendo los explantes en cámaras de crecimiento con una intensidad de luz artificial de $65 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

2.4.1. Fases de la propagación *in vitro*

La regeneración de plantas *in vitro* presenta cuatro fases principales: establecimiento del cultivo, desarrollo y multiplicación de los explantes, enraizamiento y aclimatización de las plantas. En algunas ocasiones las fases de enraizamiento y aclimatización pueden combinarse en condiciones *ex vitro*. Generalmente es importante considerar una fase previa (Fase 0), que es la etapa de preparación de los explantes para el establecimiento (Ahloowalia y col., 2004; Olmos y col., 2004).

Fase 0: Preparación del material vegetal

En esta etapa se incluye la selección de las plantas donadoras, y de una serie de pretratamientos en condiciones higiénicas controladas cuyo objetivo es mejorar la eficiencia de la implementación y desarrollo posterior del cultivo. Es una etapa decisiva para la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso desde el punto de vista genético, fisiológico y sanitario. A las plantas se les realiza un diagnóstico frente a los principales microorganismos patógenos contaminantes para eliminar las contaminadas o someterlas a tratamiento (Jiménez, 1998a; Orellana, 1998; Olmos y col., 2004).

Fase I: Establecimiento del cultivo

El objetivo de esta fase es lograr establecer un cultivo totalmente aséptico y viable con los cuales se inicia el proceso de propagación *in vitro* partiendo de plantas seleccionadas, caracterizadas genética y sanitariamente. Los ápices o yemas se colocan en medios nutritivos para lograr la formación de brotes procediéndose después a la selección del material vegetal con mejor comportamiento. Entre los factores más importantes a tener en cuenta en esta fase están el explante, desinfección del explante, los medios de cultivo, el empleo de luz y temperatura y la oxidación fenólica (Orellana, 1995; Agramonte, 2000; Olmos y col., 2004).

Los desinfectantes utilizados más comúnmente en los explantes son el etanol (70% v/v) e hipoclorito de sodio (NaClO, de 1,0 a 3,0%) y con menor frecuencia hipoclorito de calcio (CaClO) y el bicloruro de mercurio (HgCl₂) (Orellana, 1998; Gnanam, 2004).

Es necesario tener un buen balance de auxinas y citoquininas en el medio de cultivo para la formación de plantas a partir de los diferentes tipos de explante, el cual esta determinado por las concentraciones endógenas de estas hormonas presentes en ellos (Jiménez, 1998b; Olmos y col., 2004).

Fase II: Multiplicación

El objetivo de esta fase es la producción de propágulos a partir de meristemas

establecidos alcanzando la cantidad máxima de plantas y su estabilidad genética. Los factores que más influyen en los resultados de esta fase son el medio de cultivo, genotipo, número de subcultivos y estado físico del medio de cultivo. La eficiencia de esta fase está condicionada por dos variables esenciales: el coeficiente de multiplicación y las pérdidas en el proceso por la presencia de contaminaciones o mortalidad en los explantes (Orellana, 1998; Agramonte, 2000; Olmos y *col.*, 2004).

Fase III: Enraizamiento

El objetivo de esta fase es obtener plantas completas con gran vigor y calidad. En esta fase los brotes obtenidos durante la etapa de multiplicación crecen hasta formar plantas completas y desarrollar un sistema radicular que les permita ser trasplantadas a un sustrato en condiciones de casa de cultivo. Los factores que más afectan los resultados de esta fase son los reguladores de crecimiento, concentración de sales minerales, concentración de sacarosa y el estado físico del medio de cultivo (Orellana, 1998; Olmos y *col.*, 2004).

Debido precisamente a que la fase de enraizamiento es la más voluminosa dentro del proceso de propagación *in vitro* y puede limitar el proceso de producción, existe la tendencia a la eliminación de esta fase. Para ello se han seguido varias estrategias que incluyen mejorar la calidad de los brotes durante la fase de multiplicación y las condiciones de adaptación de las plantas (Olmos y *col.*, 2004).

Fase IV: Aclimatización

La aclimatización es un proceso necesario y gradual a través del cual se reduce al mínimo las pérdidas de las plantas *in vitro* después de su trasplante a condiciones *ex vitro* donde las plantas deben adaptarse a las nuevas condiciones, de forma progresiva respecto a sus estructuras y su fisiología y deja de ser un organismo quimioheterótrofo y adaptarse a las condiciones fotoautótrofas donde se ven forzadas a sintetizar los compuestos orgánicos necesarios a partir de minerales, agua, CO₂ y luz. Este cambio en las plantas

así como su morfología determina la susceptibilidad durante los primeros días del proceso de aclimatización (Jiménez y Caballero, 1990).

Como consecuencia del ambiente *in vitro*: alteración del contenido de ceras epiculares, funcionamiento estomático anormal, disminución del contenido de clorofila, menor peso seco final, disminución del área foliar, menor número estomático, elevada variabilidad en tamaño, forma y estado de la planta, crecimiento suculento, desórdenes fisiológicos y morfológicos, menor tasa de crecimiento, presencia de contaminaciones y mayor frecuencia de mutaciones; se contribuye al desarrollo de plantas con un fenotipo incapaz de sobrevivir al trasplante a invernadero. Estos aspectos fisiológicos hacen necesaria una fase que permita el retorno gradual de estas plantas a sus características normales a través de una disminución gradual de la humedad relativa e incremento gradual de la intensidad de luz (Preece y Sutter, 1991; Denng y Donelly, 1993).

Todos estos cambios provocan que una gran parte de las plantas propagadas *in vitro* no sobrevivan al trasplante a las condiciones ambientales, lo que hace necesario aplicar técnicas de aclimatización *in vitro* o *ex vitro*, que garanticen un retorno gradual de éstas a sus características morfológicas normales (Jiménez y col., 2001).

Las plantas producidas *in vitro* presentan la cutícula poco desarrollada, debido a la alta humedad relativa presente (90-100%), lo que provoca una pérdida de agua postrasplante, las hojas son delgadas, blandas y fotosintéticamente poco activas, presentando pocas y pequeñas células de parénquima empalizada, con baja eficiencia en el uso de la luz y con grandes espacios en el mesófilo; los estomas no operan adecuadamente, siendo la causa de la mayor pérdida de agua durante las primeras horas de aclimatización, a su vez existe una pobre conexión vascular lo que reduce la conducción de agua, además las raíces son poco funcionales presentando epidermis no suberificadas y pocos pelos radicales los que generalmente mueren postrasplante y deben ser regenerados (Cheliak, 1993; Gravina, 1995).

Lo fundamental en esta fase es que las plantas formen un buen sistema radical, debido a que su nutrición dependerá durante mucho tiempo y en gran parte de la efectividad de sus

raíces. Este periodo es crucial en la vida de las plantas, para evitar situaciones de estrés al inicio de su desarrollo, cuyas manifestaciones podrían no ser observables hasta que el individuo no haya alcanzado la fase adulta (Mroginski y Roca, 1993). Los déficit de agua limitan la tasa fotosintética debido a la disminución del grado de hidratación de los protoplastos y particularmente los cloroplastos, esto trae como consecuencia una alteración en la estructura coloidal y una disminución en la actividad enzimática y reducción en el proceso metabólico (Beadle y *col.*, 1993).

Las plantas *in vitro* son muy sensibles a los cambios en la intensidad de la luz especialmente en las dos primeras semanas de trasplante. Los cambios en los carotenos y las enzimas oxidasas reflejan que las plantas en cultivo de tejidos pueden desarrollar mecanismos de defensa a las dos o tres primeras semanas de aclimatización y se recomienda aclimatizar primero a bajas intensidades luminosas y después aumentar la luz gradualmente (Capellades y *col.*, 1991; van Huylenbroeck y *col.*, 1996; 1997).

Los factores a considerar durante la aclimatización de las plantas son: promover el metabolismo fotoautótrofo, reducir las pérdidas de agua (Kirdmanee y *col.*, 1995a) y enriqueciendo de CO₂ las plantas *in vitro* pretrasplante (Kirdmanee y *col.*, 1995b), con lo cual se asegura un mayor crecimiento y alto porcentaje de supervivencia.

Esta fase se realiza en áreas preparadas especialmente para ello, las cuales poseen un cobertor que logra disminuir las radiaciones solares sobre un 50 a 70%, con instalaciones de riego localizado. Se utilizan diferentes tipos de recipientes para la siembra de las plantas, generalizándose actualmente a las cajas de polieturano de alta densidad (Jiménez y Agramonte, 1997).

El objetivo es lograr la supervivencia de las plantas al momento del trasplante, así como su crecimiento hasta alcanzar un desarrollo que les permita ser trasplantadas a campo abierto. La eficiencia de está en función del grado de supervivencia de las plantas durante el tiempo de aclimatización. Los factores que más inciden en esta fase son el manejo de las plantas, tipo de instalaciones utilizadas, sustrato y el cumplimiento de las operaciones

tecnológicas como el riego y la fertilización, principalmente (Agramonte y col., 1998; Ahloowalia y col., 2004; Olmos y col., 2004).

Por otro lado, durante esta fase los principales problemas que se presentan están relacionados con la muerte por desecación y enfermedades, de ahí que se debe tener especial cuidado en la composición del sustrato utilizado y las condiciones ambientales de la casa de cultivo (González y col., 1999; Jiménez, 2000).

Se han realizado diversos trabajos sobre la propagación *in vitro* de *Morus* (Lu, 2002; Vijayan y Padmaja, 2005; Benedetta y col., 2007), sin embargo, no se evaluaron las plantas *in vitro* en condiciones de aclimatización y campo.

2.4.2. Los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) en la propagación *in vitro*

Las técnicas de cultivo de tejidos constituyen poderosas herramientas que pueden ser aplicadas con éxito para la micropropagación clonal masiva de plantas con alto valor genético y fisiológico, es por ello que resolver los problemas que aún persisten en la búsqueda de tecnologías que faciliten la automatización y el mejoramiento de la calidad de las plantas previas a la aclimatización resultan de gran importancia y constituyen limitaciones en el campo de la Biotecnología Vegetal (Escalona y col., 1999).

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) basados en el contacto intermitente de los explantes con el medio de cultivo, constituyen una tecnología accesible y permiten una mayor facilidad para el desarrollo de los procesos a gran escala, el aumento de la productividad del material propagado y una reducción de los costos de producción. Estos han sido diseñados en varios tamaños y formas con el uso o no de soportes para las plantas, forma y frecuencia de aplicación de los nutrientes entre otras especificaciones que los diferencian en el manejo y el costo (Aitken-Christie, 1991; Lorenzo y col., 1998; Ventura y col., 1998; Escalona y col., 1999).

En la actualidad existe la tendencia a utilizar los medios de cultivo en estado líquido en los SIT debido a las mejores tasas de proliferación y crecimiento de los explantes en relación con los de semisólido y por el contacto intermitente de los explantes con el medio de

cultivo y la renovación constante del oxígeno (Ilan y col., 1995; Escalona y col., 1999; Pérez, 2001). Además de incrementar la calidad del material vegetal producido, se disminuyen los costos de producción por el no uso de gelificante (Smith y Spomer, 1995; Etienne y Berthouly, 2002), los cuales generalmente limitan el uso comercial de los productos de la propagación *in vitro* por aumentar el costo de la planta producida por cultivo de tejidos como es el caso de las ornamentales, plantas de follaje y frutales selectos (Simonton y col., 1991).

En los SIT intervienen una serie de factores que posibilitan una mejor respuesta fisiológica logrando mayor eficiencia en el cultivo con respecto a los medios estáticos. La duración del tiempo de inmersión tiene gran importancia tanto para la asimilación de los nutrientes como para controlar la hiperhidricidad que puede aparecer en los explantes desarrollados en medios de cultivo líquido, controlando así la atmósfera interna del recipiente de cultivo (Escalona y col., 1999).

Los SIT se desarrollaron con el objetivo de reducir los problemas por hipoxia e hiperhidricidad, los daños mecánicos, la complejidad del equipamiento así como lograr un aumento en la eficiencia de la propagación dado por el incremento de los ritmos de producción y la calidad de los propágulos (Alvard y col., 1993; Teisson y Alvard, 1994; Escalona y col., 1999). Estos sistemas proveen a todos los explantes de un contacto con el medio de cultivo durante un período de tiempo muy corto con una determinada frecuencia diaria, además es de fácil manejo y uso.

Cuando los SIT se utilizan con fines comerciales es importante tomar en cuenta el crecimiento, producción y calidad del material vegetal cultivado y compararlo con el material producido en los sistemas de cultivo convencionales (Etienne y Berthouly, 2002), por lo cual Ventura y col., (1998) en banano FHIA 18 (*Musa sp.*), Escalona y col., (1999) en piña (*Ananas comosus* Merril.), Lorenzo y col., (2001) en caña de azúcar (*Sacharum officinarum* L.), Pérez (2001) en papa (*Solanum tuberosum* L.) asimismo Castro y González (2002) en eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) indican que con el

empleo de los SIT se logran incrementos entre 300 a 400% en la tasa de multiplicación respecto al medio de cultivo semisólido y líquido estático.

Sin embargo, en *Morus* no se encontraron referencias sobre el uso de los sistemas de inmersión temporal.

2.5. Análisis molecular de plantas propagadas *in vitro*

La propagación asexual de las plantas, es una práctica que se lleva a cabo de manera tradicional para numerosas especies, ya que en teoría permite obtener clones fenotípica y genéticamente idénticos a la planta madre. En la actualidad, la biotecnología permite obtener gran cantidad de individuos a partir de tejido, mediante propagación *in vitro*. Sin embargo, se han encontrado diferencias fenotípicas y genéticas entre individuos propagados asexualmente, tanto en forma tradicional como por cultivo de tejidos (Aravanopoulos, 2003).

La propagación *in vitro* es una alternativa de gran utilidad para la producción de “semilla” de alta calidad, la introducción de nuevos cultivares y la sustitución rápida de otros ante problemas fitosanitarios o desastres naturales. Sin embargo, el empleo de las técnicas biotecnológicas en plantas pueden provocar cambios genéticos lo cual es necesario detectar antes de que el material vegetal se trasplante a condiciones de campo (Mederos y col., 2002).

Mediante el análisis molecular, se ha encontrado un vasto campo de aplicación y se ha convertido en un auxiliar en investigaciones de diversa índole, entre ellas identificar las características genéticas entre individuos. En cultivo de tejidos vegetales pueden utilizarse para determinar la fidelidad genética entre explantes y brotes regenerados *in vitro*, en investigaciones sobre el origen y mecanismos de la variación somaclonal, en la identificación de fenotipos mutantes y como control de la propagación vegetativa y de la embriogénesis somática (Rodríguez y col., 2003a; Torres y col., 2006a).

En morera, la propagación *in vitro* juega un papel importante en la producción de germoplasma a través de la propagación rápida y masiva de individuos genéticamente superiores y es importante para su preservación y utilización, e investigar la variación

genética de las plantas obtenidas mediante este método de regeneración (Pan, 2000; Bhattacharya y col., 2005; Zhao y col., 2007a).

2.5.1. Repeticiones de secuencias inversas marcadas

Los ISTR (del inglés *Inverse Sequence-Tagged Repeat*) son marcadores basados en secuencias de retrotransposones y estos son elementos genéticos que se mueven dentro del genoma de un organismo vía ARN (ácido ribonucleico). Existen en la mayoría de las plantas y son secuencias que se auto-repican y reinsertan en diferentes partes del genoma (Rohde, 1996).

El ISTR es una técnica nueva basada en PCR que permite el análisis del genoma en los reinos vegetal y animal. Esta técnica surgió al estudiar el ADN (ácido desoxiribonucleico) genómico de coco (*Cocos nucifera* L.) con la enzima EcoRI, el cual mostró fragmentos de 1,3-1,4 kb, producto del corte con la enzima, estos fragmentos más la región espaciadora fueron secuenciados y revelaron una alta homología con parte del elemento copia BARE-1 en otra especie vegetal (Weising y col., 2005).

Para realizar la técnica ISTR se debe considerar que el genoma de las plantas contiene elementos repetitivos extendidos, muchos de los cuales son elementos genéticos móviles (transposones) que son capaces de cambiar su posición dentro del genoma. De acuerdo con el mecanismo de transposición, los elementos genéticos móviles en eucariotas se dividen en dos clases: transposones (retrotransposones) capaces de realizar transposición mediante un intermedio de ARN y, transposones, capaces de propagarse mediante un intermediario de ADN (Weising y col., 2005). Entre estos elementos transposones, los retrotransposones constituyen el grupo más grande, y se agrupa en dos clases principales que dependen de la presencia o ausencia de bandas directas largas terminales repetidas (LTR) (Rohde, 1996). Estas se caracterizan por la presencia de aproximadamente 300-500 pares de bases largas directas repetidas en ambos lados del elemento. Estas LTR son altamente conservadoras y se rompen de acuerdo con la secuencia del cebador basado en el desarrollo de los retrotransposones marcados.

Una gran variedad de técnicas moleculares utilizan cebadores de PCR en los elementos transposones (Flavell y col., 1998; Kalendar y col., 1999; Chang y col., 2001; Edwards y col., 2002). Una de estas técnicas incluye las repeticiones de secuencias inversas marcadas (ISTR) (Rohde, 1996). Los marcadores ISTR se aplican universalmente mediante la utilización de cebadores idénticos derivados de las secuencias copia del coco tomado del genoma de las eucariotas (Rohde y col., 1995; Rohde, 1996).

La técnica está compuesta de cebadores delanteros y traseros de 15 a 21 pares de bases en longitud. Los marcadores ISTR son comparables a los marcadores AFLP (del inglés: *Amplified Fragment Length polymorphism*) con respecto a su polimorfismo y al número de loci detectados (Rohde, 1996; Capote y col., 2007).

Basado en la presencia abundante de los elementos copia en el reino vegetal, se examinaron los ADNs de otras especies de plantas, con el objetivo de demostrar la presencia de estos elementos en otros cultivos además del coco. Para esto se diseñaron cebadores a partir de la secuencia ya conocida de estos elementos copia, que fueran capaces de copiar la región entre ellos (de ahí el término de secuencia invertida), que es lo que realmente genera polimorfismo. Los resultados mostraron que la secuencia EcoRI de 1,3-1,4 kb completa, puede ser explotada para la síntesis de cebadores ISTR y la generación de ADN polimórfico. Además, estas secuencias copia, independientemente de su longitud, están aparentemente distribuidas entre los genomas eucarióticos tal que, una amplificación mediante PCR con dos cebadores ISTR resulta en patrones de huellas de ADN distintos y reproducibles (Rohde, 1996; Chang y col., 2001; Edwards y col., 2002).

Aunque se necesitan estudios más intensos, se ha sugerido que la reproducibilidad de la técnica es alta, como lo demostró el estudio con ocho preparaciones individuales de ADN (cuatro con material idéntico y la otra mitad con diferente material foliar) procedente del mismo cocotero, en el cual se obtuvieron patrones ISTR idénticos (Rohde, 1996).

Las técnicas ISTR utilizan el procedimiento analítico con gel de secuencia. El gran número de loci detectados en un único análisis ISTR conjuntamente con el alto porcentaje de fragmentos polimórficos, se compara favorablemente con la recientemente

desarrollada tecnología AFLP, y con algunas ventajas sobre esta última, tales como: después del aislamiento del ADN no son necesarias manipulaciones adicionales en el caso del ISTR; la restricción del ADN genómico por dos enzimas diferentes, la adición catalizada por la T4 ADN ligasa a los adaptadores y la preamplificación como parte del protocolo de la técnica de AFLP, no solo son consumidoras de tiempo, sino que además, en la reacción de ligazón se requiere ADN muy puro, el cual es técnicamente difícil de obtener; la adición de nucleótidos terminales únicos a los adaptadores/cebadores AFLP para una amplificación de la PCR discriminatoria, invoca a un equipo de PCR confiable y altamente exacto, si se desean obtener resultados reproducibles y los tres pasos adicionales (restricción, ligazón y preamplificación) encarecen la técnica AFLP respecto al ISTR (Rohde y col. 1995; Demey y col., 2004; Torres y col. 2006b).

Las aplicaciones prácticas de la técnica ISTR están aparentemente centuplicadas y abarcan desde la determinación general de la biodiversidad, la caracterización de especies silvestres, manejo de banco de genes, estudio sobre la genética de las poblaciones, caracterización de patógenos, huellas de variedades para su identificación, siguiendo la introgresión de genes, estudios sistemáticos hasta una posible selección asistida por marcadores en el mejoramiento por la identificación de marcadores cosegregantes con caracteres deseables (Rohde y col., 1999; Ramírez y col., 2002; Aga, 2005; Aga y Bryngelsson, 2006).

Comparada con las metodologías disponibles, los marcadores ISTR representó un descubrimiento significativo en cuanto a precio, facilidad, precisión, flexibilidad y velocidad, por lo cual varias especies de plantas se han sometido al análisis mediante esta técnica, entre las cuales se encuentran los cereales (cebada, maíz, centeno y trigo), frutas (vid, guayaba, ciruela, fresa, aguacate), plantas de aceite (coco y palma de aceite, semillas de nabo, soya) y otros como la yuca, papa, remolacha, tabaco, tomate, o hierbas como la menta y perejil. Se han probado también otros materiales vegetales, como *Arabidopsis*, árboles (cedro, pino, eucalipto) y varias plantas ornamentales (brezo,

petunia, rosas, *Forsythia* y hierba becerra) (Sensi y col., 1996; Rohde y col., 1999; Ramírez y col., 2002; Aga, 2005; Welters y Muller, 2007).

Sin embargo, de acuerdo con la literatura científica consultada, no se ha empleado la técnica ISTR en morera.

2.5.2. Investigaciones en morera con marcadores de ADN

Hunter y Markert (1957) fueron los primeros en introducir las isoenzimas como marcadores genéticos en plantas. Hirano (1977) utilizó la técnica de la isoenzima peroxidasa para evaluar las afinidades de la morera con sus parientes, y sus resultados fueron similares a los obtenidos mediante el método genético convencional. Por su parte, Hirano y Naganuma, (1979) iniciaron el estudio de la herencia de la peroxidasa en morera y establecieron que la isoenzima tiene una correlación significativa con el largo de la hoja. Posteriormente, Hirano (1980) empleó esta técnica para analizar 284 variedades de la morera mediante el uso de siete sistemas enzimáticos y una proteína de savia para caracterizar estas variedades. Basado en el modelo de electroforesis, este autor categorizó 131 variedades en siete grupos y estableció una relación genética estrecha entre ellas. También demostró la correlación entre el contenido de aminoácidos y la peroxidasa en la hoja. En su estudio, Katagiri y col., (1994) también utilizaron la técnica de esta isoenzima para diferenciar los genotipos hexaploides de morera colectados en México.

Por otra parte, en la India, se realizaron estudios con la isoenzima para introducir algunas especies triploides (Venkateswaralu y col., 1995) y aneuploides (Venkateswaralu y col., 1989a) de morera provenientes de Indonesia (Venkateswaralu y col., 1989b). Aunque el análisis de peroxidasa fue comparativamente fácil, menos costosa y los marcadores fueron codominantes en la expresión, fueron menos atractivos comparados a los marcadores de ADN debido a la falta de suficiente polimorfismo.

Los estudios en el genoma de la morera se realizaron en Japón por Katagiri y col., (1994), quienes aislaron con éxito ADN de cloroplastos. Luego Machii (1989) aisló el ADN total mediante ultracentrifugación. Posteriormente, Chengfu y col., (1996) observaron

variaciones en los marcadores genéticos al utilizar 24 cebadores de tipo RAPD en 12 variedades de morera. Por otro lado, fueron examinadas las unidades taxonómicas operacionales (12 especies y dos variedades) del género *Morus* con 20 cebadores RADP, y se generaron 238 marcadores polimórficos (Lichun y col., 1997).

Al analizar el polimorfismo en el ADN genómico de cinco genotipos y sus cuatro híbridos resultantes, mediante RAPD (Lou y col., 1998), se observó que en los F1 la mayoría de los marcadores obtenidos fueron similares a los de sus respectivos progenitores. Sharma y col. (2000) evaluaron la diversidad genética en una colección de germoplasma del género *Morus* utilizando fluorescencia basada en marcadores AFLP e indicaron que el amplio rango de similitud genética (0,58–0,99) de la colección de germoplasma representaba una población genéticamente diversa. Sin embargo la base genética de la morera cultivada era muy estrecha.

En otro estudio, Bhattacharya y Renade, (2001) observaron que con cinco cebadores RAPD (del inglés: *Random Amplified Polymorphic DNA*) y uno DAMD (del inglés: *Directed Amplification of Minisatelite DNA*) se generaron los perfiles genéticos que podían diferenciar las nueve variedades en términos de número de bandas. Por su parte, el Centro de Recursos, Germoplasma y Sericultura Central en colaboración con el Laboratorio de investigaciones Seribiotecnológicas de la India, caracterizaron el germoplasma de morera y en los análisis mediante RAPD en 15 especies de morera fueron revelados pocos marcadores de diagnóstico e indicaron la posible utilidad de la técnica en la identificación de estas especies. Sin embargo, en el análisis filogenético mediante marcadores RAPD e ISSR se observó la separación de especies silvestres y cultivadas de morera en diferentes cluster. Por otro lado, en la evaluación de 44 variedades cultivadas de *Morus alba* L. y 27 de *Morus laevigata* L. mediante marcadores RAPD se obtuvo la generación de información útil de diversidad genética e identidad.

De acuerdo con la importancia que tiene la morera tanto para producción como para investigación, a los antecedentes encontrados en la revisión bibliográfica respecto a esta especie vegetal y la aplicación del cultivo *in vitro* y ante la problemática que se ha

observado para su propagación y cultivo, el presente trabajo se desarrolló mediante la siguiente que se describe a continuación.

.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Propagación Masiva del Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas y en la Finca “La Yolanda” ubicada en el municipio de Santa Clara, provincia de Villa Clara, Cuba.

Técnicas y procedimientos generales

Material vegetal

Como material de partida se utilizaron plantas de *Morus alba* L. variedad Criolla de una plantación de cuatro años de cultivo, plantadas en el Área Experimental de la Facultad de Ciencias Agropecuarias perteneciente a la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.

Las plantas seleccionadas como donantes de explantes, fueron sometidas a una poda de uniformidad a una altura de 60 cm desde la base del tallo, para estimular la brotación de yemas jóvenes. Posteriormente, a los cuatro meses se colectaron directamente de campo las yemas apicales con aproximadamente 4,0 cm de longitud, las cuales se utilizaron como explantes iniciales (Figura 1). Estas fueron llevadas al laboratorio en un recipiente de plástico con tapa (capacidad para 500 mL) para evitar la deshidratación. Seguidamente, se lavaron con agua corriente y se colocaron en un agitador orbital a 100 rpm durante cinco minutos, sumergidos en una solución de agua con detergente industrial. Luego se enjuagaron cuatro o cinco veces con agua para eliminar el detergente y emplearlas en el experimento de desinfección.

Instrumental de laboratorio

La desinfección de pinzas y bisturís usados para la manipulación de los explantes se realizó según la metodología propuesta por Agramonte y col., (1993) y las placas de Petri utilizadas para la disección de los explantes, fueron esterilizadas en una estufa a 180°C durante dos horas. Las operaciones de transferencia *in vitro* de los explantes se llevaron a

cabo en condiciones estériles mediante el uso de una cabina de flujo laminar horizontal (modelo IKEM).

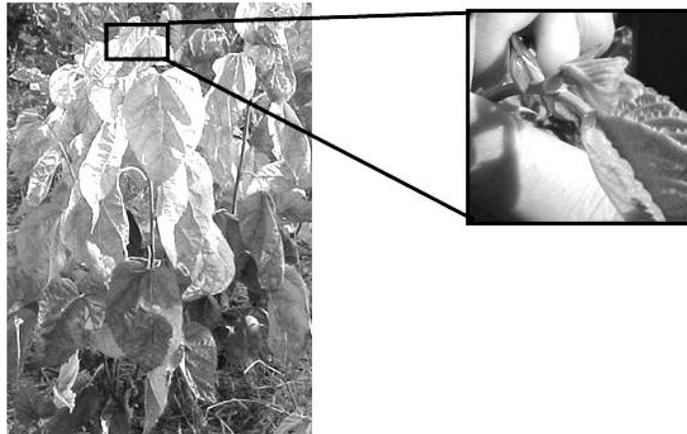


Figura 1. Yema apical de *Morus alba* L. variedad Criolla procedente de rebrotes de cuatro meses, utilizada para el establecimiento *in vitro*.

Medios de cultivo

El medio de cultivo que se empleó en todos los experimentos estuvo compuesto por las sales inorgánicas propuestas por Murashige y Skoog (1962), 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 1,0 mg.L⁻¹ de tiamina y 30 g.L⁻¹ de sacarosa, el cual será referido posteriormente como MSM.

La esterilización de los medios de cultivo, frascos y tubos de ensayo, se realizó en autoclaves a 121°C y 1,2 kg cm⁻² durante 20 minutos, mientras que el pH se ajustó a 5,8 previo a la esterilización, con soluciones de NaOH (0,1N) y HCl (0,1N). En los medios de cultivo semisólidos se adicionó gelrite (SIGMA Co.) como gelificante a razón de 2,0 g.L⁻¹.

Condiciones de crecimiento *in vitro*

Los explantes se colocaron en cámaras en crecimiento bajo condiciones de luz solar indirecta con una duración máxima y mínima promedio del período luminoso de 13 horas con 19 minutos y 10 horas con 41 minutos respectivamente, una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 50.0-62.5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a 27±1°C (Agramonte, 2000).

Análisis estadístico

Los datos de las variables número de explantes contaminados, número de explantes viables, número de explantes brotados y supervivencia, fueron transformados mediante la prueba de proporciones arco seno ($\sqrt{x+1}$) y para los brotes por explante con \sqrt{x} , previo a su análisis estadístico (Snedecor y Cochran, 1968). Los datos fueron procesados mediante un análisis de varianza de clasificación simple (diseño completamente al azar), previa comprobación de la normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas. Se utilizó el paquete computacional SPSS versión 16.0 para Windows (SPSS, 2008), la prueba de comparación de medias de Tukey (Steel y Torrie, 1992) y se estableció el nivel de significancia de todas las pruebas en 5%. En cada experimento se detallan los análisis estadísticos específicos realizados.

Como los experimentos se realizaron en serie, en cada uno de los acápites se tomaron en cuenta los resultados obtenidos previamente.

3.1. Fase de establecimiento

En todos los experimentos de establecimiento se emplearon tubos de ensayo con una capacidad de 55 mL (25 x 150 mm), en los cuales se adicionaron 10 mL de medio de cultivo semisólido o líquido, según el experimento. En los casos en que se utilizaron medios de cultivo líquidos, se usaron soportes de papel filtro para evitar la muerte del explante por hipoxia (Figura 2).



Figura 2. Empleo de soporte de papel filtro en el establecimiento *in vitro* de yemas apicales de *Morus alba* L. variedad Criolla en medio de cultivo líquido.

3.1.1. Influencia del hipoclorito de sodio en la desinfección de yemas apicales de morera

Este experimento se realizó con el objetivo de determinar el efecto de la concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de exposición sobre la desinfección de las yemas apicales. Estas yemas, previamente lavadas con agua y detergente, fueron desinfectadas con etanol al 70% durante un minuto (García y col., 2002; Vijayan y Padmaja, 2002). Luego fueron sometidas a tres concentraciones (0,5; 1,0 y 1,5%) (v/v) de hipoclorito de sodio y tres tiempos de exposición (10, 15 y 20 minutos). Posteriormente, se eliminaron las hojas de cubierta y las bases cloróticas de los explantes, para obtener un explante de aproximadamente 1,0 cm de longitud.

Se utilizó el medio de cultivo MSM en estado semisólido. Las evaluaciones se realizaron a los 21 días posteriores al proceso de desinfección. Las variables evaluadas fueron: número de explantes contaminados y número de explantes viables expresadas en porcentaje. Se emplearon 30 repeticiones por tratamiento y un explante por tubo de ensayo. Para el procesamiento estadístico de los datos se aplicó un ANOVA de clasificación simple para determinar el efecto de la concentración del hipoclorito de sodio y el tiempo de desinfección.

3.1.2. Efecto de 6-BAP, KIN y el estado físico del medio de cultivo sobre el establecimiento de yemas apicales

El objetivo del presente experimento fue determinar el efecto de las citoquininas y el estado físico del medio de cultivo sobre el establecimiento *in vitro* de las yemas apicales. Se evaluaron cuatro concentraciones (0,25; 0,5; 1,0 y 2,0 mg.L⁻¹) de 6-BAP y KIN, dos estados físicos del medio de cultivo (semisólido y líquido) y sus respectivas combinaciones y un control sin reguladores del crecimiento.

Las variables evaluadas a los 28 días de cultivo fueron: número de brotes por explante, longitud de los brotes (cm) y número de yemas brotadas (%). Se emplearon 30 repeticiones por tratamiento y un explante por tubo de ensayo. Los datos fueron

analizados mediante un ANOVA de clasificación simple para determinar el efecto del estado físico del medio de cultivo, el tipo y la concentración de las citoquininas.

3.2. Fase de multiplicación

Inducir la proliferación de los brotes fue el objetivo fundamental en este acápite, en el cual se emplearon segmentos nodales de plantas *in vitro* procedentes de la fase de establecimiento, de 1,0-1,5 cm de longitud con una yema axilar y una hoja (Figura 3).

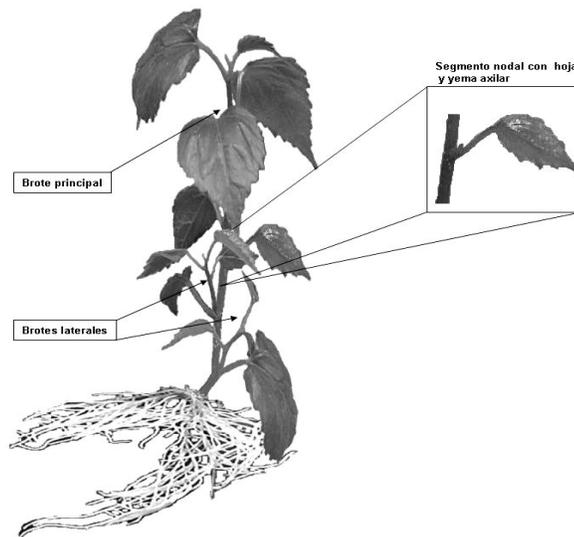


Figura 3. Segmento nodal con hoja y yema axilar utilizado en la fase de multiplicación *in vitro* de *Morus alba* L. variedad Criolla.

Se utilizaron 10 frascos de vidrio de 250 mL de capacidad en cada tratamiento, a los que se les adicionaron 25 mL de medio de cultivo MSM semisólido y se colocaron cuatro segmentos nodales por frasco. Para la evaluación de la longitud de los brotes se consideró la longitud (cm) desde la base de la planta *in vitro* hasta el ápice del brote principal.

El coeficiente de multiplicación se determinó mediante el cociente entre el número de segmentos nodales totales obtenidos al momento del subcultivo y el número de segmentos nodales iniciales (Gnanam, 2004).

3.2.1. Efecto de 6-BAP y ANA sobre la proliferación de brotes de morera

Este experimento se llevó a cabo con el objetivo de determinar la respuesta *in vitro* de los explantes a la adición de 6-BAP solo o combinado con el ácido naftalenácetico (ANA) para seleccionar la mejor combinación de estos reguladores del crecimiento en la proliferación de brotes en la fase de multiplicación. Se empleó como control un tratamiento sin reguladores del crecimiento (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos evaluados para determinar el efecto de 6-BAP solo o combinado con ANA en la fase de multiplicación *in vitro* de *Morus alba* L. variedad Criolla

Tratamientos	Concentración (mg.L ⁻¹)
Control	Sin reguladores
1	0,25 6-BAP
2	0,50 6-BAP
3	1,00 6-BAP
4	0,25 6-BAP + 0,25 ANA
5	0,25 6-BAP + 0,50 ANA
6	0,25 6-BAP + 1,00 ANA
7	0,50 6-BAP + 0,25 ANA
8	0,50 6-BAP + 0,50 ANA
9	0,50 6-BAP + 1,00 ANA
10	1,00 6-BAP + 0,25 ANA
11	1,00 6-BAP + 0,50 ANA
12	1,00 6-BAP + 1,00 ANA

Las variables evaluadas a los 28 días fueron: longitud de los brotes (cm), número de brotes por explante y se calculó el coeficiente de multiplicación como se mencionó anteriormente. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple.

3.2.2. Influencia del número de subcultivos sobre la multiplicación de morera

Se realizó este experimento con el objetivo de determinar la influencia de los subcultivos continuos sobre la proliferación de morera. Se utilizaron segmentos nodales de plantas *in*

in vitro procedentes de la fase de establecimiento, los cuales se colocaron en medio de cultivo MSM semisólido con 0,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP y 0,5 mg.L⁻¹ de ANA.

Se realizaron evaluaciones cada 28 días durante 10 subcultivos. Se evaluaron las siguientes variables: longitud de los brotes (cm), número de brotes por explante y coeficiente de multiplicación. Los datos fueron procesados mediante un análisis de varianza de clasificación simple.

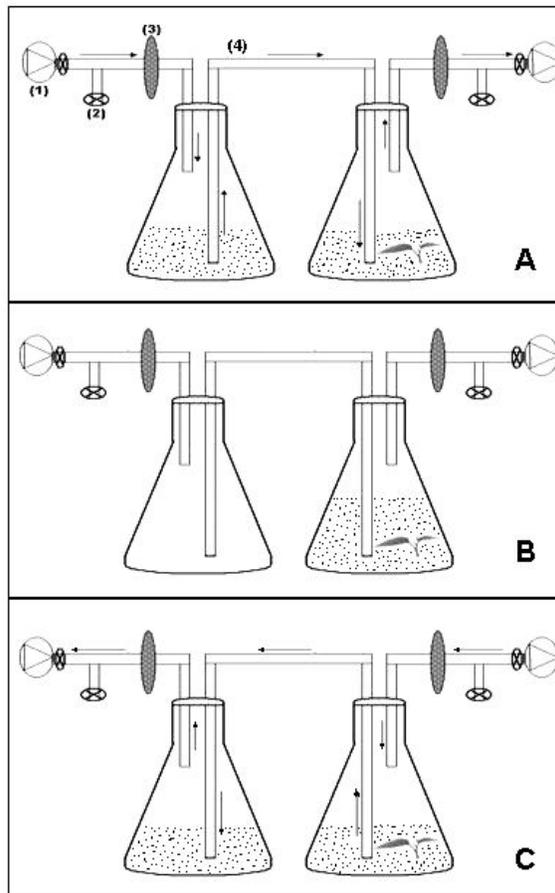
3.2.3. Multiplicación de morera en Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)

Una vez conocida la respuesta de los segmentos nodales en la fase de multiplicación en medio de cultivo semisólido y considerando las ventajas que pudiera proporcionar la utilización del medio de cultivo líquido, se determinó la influencia de los sistemas de cultivo basados en la inmersión temporal de las plantas sobre la multiplicación de morera vía yemas axilares.

Como material vegetal se utilizaron segmentos nodales procedentes de plantas *in vitro* del segundo subcultivo de multiplicación, con similares características a las descritas en el acápite 3.2.

El tipo de SIT que se utilizó fue el propuesto por Jiménez y *col.*, (1999) modificando el tipo y la capacidad del frasco. El sistema de inmersión temporal estuvo compuesto por dos frascos de cultivo de vidrio de 1000 mL de capacidad (Erlenmeyer), uno para el crecimiento de los segmentos nodales y el otro como reservorio del medio de cultivo (500 mL). Estos frascos de cultivo se conectaron entre sí por una manguera de silicona de seis milímetros de diámetro, mediante conectores de vidrio que atravesaron la tapa del frasco. En la parte interna se colocó una manguera, la cual descendió hasta el fondo en ambos recipientes. El medio de cultivo circuló de un frasco de cultivo a otro en dependencia de la apertura o cierre de dos electroválvulas de tres vías, las cuales estaban conectadas a un temporizador programable para determinar el tiempo y la frecuencia de la inmersión. A la entrada de los frascos de cultivo se colocaron filtros hidrofóbicos (0,22 µm, Midisart 2000,

Sartorius Co.) para garantizar la esterilidad del aire. La presión del aire proveniente del compresor, fue regulada con un manómetro (Figura 4).



A) Una válvula solenoide se abre y la presión de aire proveniente del compresor impulsa el medio de cultivo al frasco que contiene los explantes.

B) Tiempo de inmersión.

C) Después de un período de tiempo seleccionado, una segunda válvula se abre y la presión de aire regresa el medio de cultivo al frasco reservorio de medio de cultivo.

Figura 4. Esquema del Sistema de Inmersión Temporal empleado en la fase de multiplicación *in vitro* de *Morus alba* L. variedad Criolla. (1). Compresor de aire, (2). Válvula solenoide, (3). Filtros hidrofóbicos y (4). Tubos de silicona autoclavables (modificado de Jiménez y col., 1999).

Los Sistemas de Inmersión Temporal con el medio de cultivo, se esterizaron durante 40 minutos en autoclaves a una temperatura de 121°C y 1,2 kg.cm⁻² de presión.

3.2.3.1. Efecto de la frecuencia de inmersión

El objetivo de este experimento fue determinar la influencia de la frecuencia de inmersión sobre la proliferación de los brotes de morera. El medio de cultivo utilizado fue el MSM con 0,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP y 0,5 mg.L⁻¹ de ANA. Se emplearon 10 segmentos nodales por

sistema y tres réplicas por tratamiento, así como un tiempo de inmersión de un minuto.

Los tratamientos fueron los siguientes:

- a) 2 inmersiones por día
- b) 4 inmersiones por día
- c) 8 inmersiones por día
- d) 12 inmersiones por día

Se evaluó el número de brotes por explante y la longitud de los brotes (cm) y se calculó el coeficiente de multiplicación a los 28 días de cultivo. Los datos fueron procesados mediante un análisis de varianza de clasificación simple.

3.2.3.2. Influencia de la densidad de explantes por SIT

Se llevó a cabo este experimento con el objetivo de determinar el efecto de la densidad de explantes por sistema de inmersión temporal sobre la multiplicación de la morera vía yemas axilares.

Se emplearon las mismas condiciones experimentales y el medio de cultivo que en el anterior experimento y una frecuencia de inmersión de cuatro por día. Se evaluaron tres densidades: 10, 15 y 20 explantes por sistema. Se realizaron dos subcultivos con una duración de 28 días cada uno. Las evaluaciones se llevaron a cabo en el segundo subcultivo y se midió la longitud de los brotes (cm), número de brotes por explante, coeficiente de multiplicación, masa fresca (g) y masa seca (g). La masa seca se determinó mediante el secado de los brotes en una estufa de aire forzado a 60°C durante 72 horas hasta peso constante. Los datos fueron procesados mediante un análisis de varianza de clasificación simple.

3.3. Aclimatización de plantas *in vitro*

Esta fase se desarrolló con el objetivo de lograr la aclimatización de las plantas procedentes del cultivo *in vitro* bajo condiciones de casa de cultivo. El material vegetal empleado fueron plantas *in vitro* procedentes del cuarto subcultivo de la fase de

multiplicación, con una longitud de 8,0 cm. Antes de ser trasladadas a condiciones *ex vitro*, las plantas *in vitro* fueron retiradas de los frascos cuidadosamente y sus raíces se lavaron con agua corriente para eliminar los restos de medio de cultivo. Luego fueron trasladadas a la casa de cultivo en bandejas de plástico con una fina película de agua para cubrir las raíces y evitar la deshidratación.

Las estacas (E) utilizadas como control, se obtuvieron de las plantas donadoras para los experimentos *in vitro* y fueron seleccionadas de acuerdo con la metodología descrita por Sanginés y *col.*, (1999), las cuales se establecieron al mismo tiempo y con las mismas condiciones de evaluación que las plantas *in vitro*, sin aplicarles tratamiento previo para estimular la formación de raíces.

Las plantas *in vitro* y las estacas fueron plantadas en contenedores de polieturano de 70 alvéolos con una capacidad de 120 cm³ de sustrato cada uno. Se aplicó fertilizante (15:10:30) en forma de aspersion a las dos semanas del trasplante, con una solución a razón de 2,0 g por litro de agua.

Esta fase se desarrolló según la metodología propuesta por Pérez y *col.*, (1999), en una casa de cultivo cubierta por una malla plástica y un sistema de sombreo con zarán de *nylon* color negro, con el cual se logró una reducción de la intensidad luminosa aproximada de 220 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ las primeras dos semanas, para evitar pérdidas por deshidratación. Para esto se empleó un zarán con un tamaño de poro de 1,5x1,5 mm y en las semanas posteriores se utilizó otro zarán con un poro de 12x5 mm y con esto incrementar la intensidad luminosa a 435 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ aproximadamente (Luxómetro Extech Ligth meter 401025).

El riego se realizó por microaspersión mediante el sistema microaspersores (caudal de 33,3 ml.s⁻¹), con una frecuencia de seis riegos por día y una duración de dos minutos cada uno durante las primeras dos semanas. El tiempo restante de evaluación, éstos se redujeron a tres riegos por día con la misma duración. La humedad relativa y la temperatura durante esta fase oscilaron entre 80-90% y 33-35°C respectivamente. Estos

registros fueron tomados con un termo-higrómetro electrónico (EM-913) (Oregon Scientific) durante tres momentos del día (9:30 a.m.; 12:00 p.m. y 3:30 p.m.).

3.3.1. Influencia del tipo de sustrato sobre la aclimatización de plantas obtenidas mediante el cultivo *in vitro*

El objetivo de este experimento fue evaluar diferentes tipos de sustratos para la aclimatización de las plantas *in vitro*. Se utilizaron plantas obtenidas mediante el cultivo *in vitro* tanto en medio de cultivo semisólido como en los Sistemas de Inmersión Temporal con las características referidas en el acápite anterior. Se evaluaron tres variantes de sustrato de acuerdo con los resultados obtenidos en otros estudios con especies leñosas (Delgado, 2000; Trocones, 2000; Agramonte y col., 2001). Los tratamientos evaluados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2. Tratamientos evaluados para la aclimatización de las plantas *in vitro* de *Morus alba* L. variedad Criolla

Tratamiento	Origen	Sustrato
1	Medio de cultivo semisólido	Humus de lombriz al 100%
2	Sistemas de inmersión temporal	Humus de lombriz al 100%
3	Estacas	Humus de lombriz al 100%
4	Medio de cultivo semisólido	50% humus de lombriz y 50% zeolita
5	Sistemas de inmersión temporal	50% humus de lombriz y 50% zeolita
6	Estacas	50% humus de lombriz y 50% zeolita
7	Medio de cultivo semisólido	85% humus de lombriz y 15% zeolita
8	Sistemas de inmersión temporal	85% humus de lombriz y 15% zeolita
9	Estacas	85% humus de lombriz y 15% zeolita

La composición y origen de cada uno de los sustratos se muestra en el anexo 1.

El humus de lombriz fue elaborado en el Instituto de Biotecnología de las Plantas con el empleo de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*). Se utilizó como materia prima cachaza con seis meses de descomposición. La zeolita cargada (Litonita) se obtuvo de la planta "Tazajera" en Villa Clara con un rango de 3,0-4,0 mm de granulometría. La "carga" o enriquecimiento se realizó mediante la fórmula NEREA III (nutrientes en roca con empleo de agua) con macro y microelementos aplicados mediante compuestos simples, según la metodología desarrollada por Tellería y Jiménez, (1989).

Se evaluaron cuatro repeticiones con 100 plantas cada una, las cuales fueron evaluadas a los 45 días de plantadas. Las variables evaluadas fueron las siguientes: supervivencia de las plantas (%), altura de la planta (cm), número de hojas por planta, masa fresca (g.planta^{-1}) y masa seca (g.planta^{-1}). La masa fresca y seca, se determinaron en 20 plantas por repetición ó 20 brotes en el caso de las estacas. Los datos fueron procesados mediante un análisis de varianza de clasificación simple.

3.4. Caracterización morfológica en condiciones de campo de las plantas obtenidas por cultivo *in vitro*

Después de permanecer 45 días en casa de cultivo, las plantas propagadas en medio de cultivo semisólido, Sistemas de Inmersión Temporal y estacas (control) con una altura promedio de 30 cm y nueve hojas activas como mínimo, se trasplantaron a un suelo pardo sialítico mullido (Hernández y col., 2003), 600 plantas por método de propagación, con el objetivo de caracterizar morfológicamente las plantas obtenidas mediante el cultivo *in vitro* en condiciones de campo.

La preparación del terreno fue de forma tradicional (con bueyes) dado el tamaño de las parcelas, las cuales fueron de 75 m² y la parcela útil de 52 m². La densidad de plantación fue de 1,0x0,5 m entre surcos y plantas respectivamente. El riego se realizó por aniego con una frecuencia de siete días. A cada planta se le aplicó un kilogramo (peso fresco) de estiércol bovino con cuatro meses en descomposición, al momento de la plantación y posteriormente medio kilogramo por planta cada cuatro meses (Benavides, 1995; Sanginés y col., 1999).

El experimento se estableció bajo un diseño en bloques al azar con cuatro réplicas por tratamiento. Se realizaron tres evaluaciones a los 4, 8 y 12 meses de cultivo para las variables cuantitativas y una a los 12 meses para las variables cualitativas, las cuales fueron determinadas de acuerdo con el Descriptor de *Morus* spp. (Machii y col. 2000; Sohn, 2003).

Variables cuantitativas:

a) Supervivencia (%). Se evaluó tomando en cuenta la relación entre el número total de

plantas plantadas y el número de plantas vivas a los 30 días de acuerdo con Sanginés y col., (1999) y Toral y col., (1999).

b) Altura de la planta (cm). Se determinó con una regla graduada en centímetros, en 10 plantas por réplica. La altura se consideró desde la base de la planta (a nivel del suelo) hasta la base de la yema apical del tallo principal.

c) Número de hojas y ramas. Para estas variables se seleccionaron 10 plantas por réplica a las cuales se les contabilizó el número de hojas y ramas.

d) Área foliar (cm²). Para determinar esta variable se consideraron cinco hojas de la parte apical, media y basal de cinco plantas por réplica y el área total se calculó teniendo en cuenta en cada hoja, el largo (cm), el ancho (cm) y el factor de ajuste (0,7).

e) Producción de biomasa foliar en base seca (g.planta⁻¹). En cada evaluación se seleccionaron 10 plantas por réplica, a las cuales se les cosechó todo el follaje (sin el tallo). Para eliminar la cantidad de agua presente, se colocaron en una estufa de aire forzado a 60°C durante 72 horas y finalmente se obtuvo la biomasa foliar en base seca.

Variables cualitativas:

a) Forma de la hoja. Se determinó a partir de la relación entre el largo y ancho de la hoja y clasificada de la siguiente forma:

Lanceolada: 3:1

Escasamente ovada: 2:1

Ovada: 1,5:1

Ampliamente ovada: 1,2:1

Cordiforme: 1:1

b) Color de la hoja. Esta evaluación fue realizada visualmente y determinada de acuerdo con el color natural de las hojas maduras (sin considerar las dos hojas apicales) como: verde oscuro, verde y verde claro.

c) Superficie de la hoja. Determinada al pasar la mano sobre el haz de las hojas y clasificada como: lisa, ligeramente áspera, áspera y pubescente.

d) Textura de la hoja. Determinada al tomar la hoja completa y de acuerdo con su textura:

Membranosa: hojas delgadas y semitransparentes

Caratácea: hojas opacas como el papel

Cariácea: hojas gruesas y duras

e) Margen de la hoja. Determinado visualmente y clasificado como: dentado, aserrado y ondulado.

3.5. Estudio molecular de la estabilidad genética de las plantas *in vitro* de morera

El presente estudio se realizó con el objetivo de estimar, a nivel molecular, la estabilidad genética de las plantas *in vitro* de morera procedentes de medio de cultivo semisólido (SS) y sistemas de inmersión temporal (SIT) y las derivadas de estacas (E), y definir su posible utilización en un programa de producción de material de plantación de alta calidad.

Para las determinaciones se tomaron de cada método de propagación 15 hojas al azar de color verde oscuro, ausentes de daños por insectos, enfermedades y relativamente limpias. Se cortaron las láminas foliares sin la presencia del nervio central y se envolvieron en papel aluminio para conservarlas en nitrógeno líquido y ser trasladaron al laboratorio.

Para la extracción y purificación del ADN se tomaron como referencia los protocolos propuestos por Doyle y Doyle (1987) y Kochko y Hamon (1990), los cuales han sido utilizados otros autores como: Bhattacharya y Ranade (2001), Bhattacharya y *col.*, (2005), Zhao y *col.*, (2005a), Zhao y *col.*, (2007a) en otras especies del género *Morus*. Estos protocolos fueron modificados de acuerdo con el objetivo de trabajo (Anexo 2),

La cuantificación y evaluación de la pureza del ADN genómico se valoró a través de diluciones con el empleo de un espectrofotómetro (Biophotometer UV. Eppendorf AG, Germany). Mediante las relaciones de absorbancia A_{260}/A_{280} se determinó la contaminación con proteínas y A_{260}/A_{230} la presencia de compuestos de polifenoles y

polisacáridos. La integridad del ADN se determinó por electroforesis en gel de agarosa 0,8% (1xTBE: Tris-HCl 0,89 M, EDTA 0,02 M y ácido bórico 0,89 M) y fue visualizado con bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) bajo luz UV. El ADN purificado se almacenó a -20°C .

Amplificación y análisis del ADN

Se realizaron diluciones a las muestras purificadas con el fin de obtener una concentración de trabajo de $50\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Se utilizó la técnica ISTR (del inglés: *Inverse Sequence Tagged Repeat*) que es una técnica novedosa en esta especie vegetal y se basa en la reacción en cadena de la polimerasa: PCR (del inglés: *Polymerase Chain Reaction*). De los cebadores empleados (Tabla 3) se derivaron 16 combinaciones las cuales se aplicaron posteriormente a todas las reacciones realizadas en el estudio. Las condiciones para la realización de la técnica ISTR fueron similares a las descritas por Rohde (1996) con un volumen final de la reacción de PCR de $30\ \mu\text{l}$.

El programa ISTR del termociclador (Mastercycler, Eppendorf, Germany) consistió en una desnaturalización inicial de dos minutos a 94°C , seguido de 40 ciclos de: desnaturalización durante 30 segundos a 94°C , hibridación durante 30 segundos a 50°C y extensión durante dos minutos a 72°C para concluir con una extensión final de 10 minutos a 72°C . Los productos de la reacción de PCR se separaron en gel de poliacrilamida al 4.0% y se tiñeron con nitrato de plata usando el sistema Silver Sequence (Silver SequenceTM DNA. Promega Corporation. Madison, EE.UU).

Se realizó la lectura visual del gel de poliacrilamida y las bandas observadas se evaluaron de forma binaria como presencia (1) o ausencia (0) de una banda. Con estos datos se prepararon matrices binomiales, que fueron usadas para calcular valores de similitud genética entre las plantas obtenidas por SS, SIT y E utilizando el coeficiente de Jaccard y el análisis de agrupamiento con el método promedio de grupo, UPGMA (del inglés: *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*) contenido en el programa NTSYS-PC versión 2,11 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Exeter Software) (Rohlf, 2000).

Tabla 3. Secuencias de los cebadores ISTR* utilizados para la amplificación de ADN en *Morus alba* variedad Criolla.

Nombre	Secuencia 5' ... 3'	Número de bases
F3	GTCGACATGCCATCTTTC	18
F5	ATATATGGACTTAAGCAAGC	20
F8	TTGGACAACCATATTTTGA	21
F10	GATCAAAAAGTTTGGTTTCAT	21
B5	CTTCTGTGAAAGTCCTAG	18
B6	ATATATGGACTTAAGCAAGCA	21
B7	GGAATATCATTCCAATAAG	20
B8	CCTCCTTATTGGGAATGATAT	21

* Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Dirección de Investigaciones Biomédicas, Cuba

Este coeficiente también lo emplearon Bhattacharya y Ranade, (2001), Vijayan y col., (2004) y Bhattacharya y col., (2005) en otras especies del género *Morus* y, estimado como $S = N_{ab} / (N_{ab} + N_a + N_b)$, donde N_{ab} . número de bandas comunes entre las procedencias a y b, N_a . número de bandas que están presentes en “a” y ausentes en “b” y N_b . número de bandas que están presentes en “b” y ausentes en “a”.

Cabe señalar que este coeficiente mide la proporción de bandas entre dos unidades taxonómicas excluyendo aquellas ausentes en ambas unidades, por lo que se asigna un mayor peso estadístico a las bandas presentes, lo que es deseable en marcadores de tipo dominante como los ISTR. Los resultados del análisis con los marcadores fueron utilizados para estimar la variabilidad genética de las poblaciones analizadas, mediante la estimación de la heterocigosidad observada (H_o) con la relación número de genotipos heterocigóticos y el número total de genotipos analizados, y la heterocigosidad esperada (H_e) con la siguiente ecuación: $H_e = 1 - \sum q_i^2$ donde q_i es la frecuencia del alelo i en el locus estudiado.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Fase de establecimiento

4.1.1. Influencia del hipoclorito de sodio en la desinfección de yemas apicales de morera

El hipoclorito de sodio a las concentraciones y tiempos evaluados permitió la desinfección de las yemas apicales empleadas como explantes. En cuanto al porcentaje de explantes viables, los mejores resultados se lograron con el uso de la concentración 1,0% durante 15 minutos, con diferencias significativas respecto a los demás tratamientos. El valor más bajo de explantes contaminados se obtuvo a la concentración más alta (1,5%) en los tiempos evaluados. Sin embargo, en estos tratamientos disminuyó la viabilidad de los explantes en un 23,4% al considerar el valor máximo de esta variable (86,7%), por lo que el aumento en la concentración de este desinfectante de 1,0 a 1,5% resultó ser ligeramente fitotóxico para las yemas apicales, ya que se observó la muerte de los explantes por quemaduras y desecación (Tabla 4).

La sensibilidad de la morera a las altas concentraciones de hipoclorito de sodio está asociada fundamentalmente a las características estructurales de los tejidos que se utilizaron como explantes iniciales para el establecimiento. Éstos fueron cortados de las zonas apicales de los tallos y ramas, aún poco lignificados y con una cutícula muy delgada, por esta causa el hipoclorito, aún a concentraciones bajas, tuvo un efecto marcado.

Sin embargo, las concentraciones utilizadas en este experimento fueron relativamente bajas, si se comparan también con las empleadas en otras especies leñosas en las cuales se requieren para la desinfección de brotes apicales concentraciones superiores o iguales al 3,0%, como es el caso de *Ficus carica* L. (Borges y col., 2004), *Tectona grandis* L. (Abdelnour y Muñoz, 2005), *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden y *E. urophylla* S.T. Blake (Martínez y col., 2005a), *Prunus serotina* Ehrh. Espinosa y col., (2006) y *Pinus rigida* x *P. taeda* (Kim y Moon, 2007).

Tabla 4. Efecto del hipoclorito de sodio en la desinfección de yemas apicales de *Morus alba* L. variedad Criolla procedentes de plantas en campo.

Tratamientos	Explantos viables (%)		Explantos contaminados (%)	
	VT	VR	VT	VR
HS al 0,5%+10 minutos de inmersión	0,828 e	53,3	0,762 a	46,7
HS al 0,5%+15 minutos de inmersión	0,930 d	63,3	0,661 b	36,7
HS al 0,5%+20 minutos de inmersión	1,002 c	70,0	0,591 bc	30,0
HS al 1,0%+10 minutos de inmersión	1,039 bc	73,3	0,554 c	26,7
HS al 1,0%+15 minutos de inmersión	1,212 a	86,7	0,338 d	10,0
HS al 1,0%+20 minutos de inmersión	1,079 b	76,7	0,281 d	6,7
HS al 1,5%+10 minutos de inmersión	1,002 c	70,0	0,100 e	0,0
HS al 1,5%+15 minutos de inmersión	1,002 c	70,0	0,100 e	0,0
HS al 1,5%+20 minutos de inmersión	0,930 d	63,3	0,100 e	0,0
\pm EE	0,024		0,028	

a, b. Medias con letras distintas en la misma columna difieren para $p < 0,05$ de acuerdo con Tukey

HS. Hipoclorito de sodio. VT. Valores transformados mediante $\arcseno(\sqrt{x+1})$. VR. Valores reales. EE. Error estándar

Otros factores que contribuyeron para lograr una mayor efectividad en el proceso de desinfección, fue que los explantes de morera carecen de vellosidades que en algunas especies leñosas como la guayaba (*Psidium guajava* L.), hacen más difícil la acción de los desinfectantes. Igualmente, no se observó la presencia de sustancias procedentes de la oxidación fenólica, lo cual es muy común en otras especies leñosas como: *Psidium guajava* L. (Ramírez y col., 1999), *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden (Agramonte y col., 2001), *Swietenia microphylla* King. y *Cedrela odorata* L. (Rodríguez y col., 2003b).

Por otro lado, Dottin (2000), Leifert y Cassels (2001), García y col., (2002) y Olmos y col., (2004) señalaron que la desinfección de los explantes es más fácil, si éstos provienen de la parte apical de la planta, son más pequeños (debido a que los explantes se cortan de un mayor tamaño, son sometidos a la acción de los desinfectantes y luego en condiciones asépticas se reducen al tamaño final o de establecimiento) y, es muy común que las yemas cubiertas por hojas jóvenes estén asépticas.

En general se ha planteado que en las plantas leñosas resulta difícil establecer con éxito el material vegetal en condiciones *in vitro*, dado fundamentalmente a que éstas crecen en

el campo por muchos años y están expuestas a la acción directa de microorganismos, tanto endógena como exógenamente, así como también por los ciclos de letargo y las variadas formas de madurez y juvenilidad que presentan (Vidales, 2002; Ahloowalia y col., 2004). Por otro lado, el procedimiento realizado para obtener los explantes empleados en este experimento, eliminación de las hojas de cubierta y las bases cloróticas, pudieron influir en el proceso de desinfección dado por el alto porcentaje de explantes viables obtenidos y el bajo porcentaje de explantes contaminados.

4.1.2. Efecto de 6-BAP, KIN y el estado físico del medio de cultivo sobre el establecimiento de yemas apicales

Se observaron los mejores resultados al emplear 6-BAP, tanto en medio de cultivo líquido como semisólido, en relación con la kinetina. Sin embargo, el mayor porcentaje de yemas brotadas con diferencia significativa respecto a los demás tratamientos, se obtuvo con esta citoquinina en medio de cultivo líquido. Se constató, además, un mayor efecto del tipo de citoquinina respecto al estado físico del medio de cultivo, lo cual se hizo evidente al no existir diferencias significativas entre los tratamientos control del estado físico del medio de cultivo sin reguladores de crecimiento (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto del estado físico del medio de cultivo y el tipo de citoquinina sobre la variable número de yemas brotadas en la fase de establecimiento *in vitro* de *Morus alba* L. variedad Criolla.

Tratamiento	Yemas brotadas (%)	
	VT	VR
Medio de cultivo líquido+6-BAP	1,263 a	(89,8)
Medio de cultivo líquido+KIN	1,161 c	(83,13)
Medio de cultivo líquido sin reguladores	1,067 e	(75,5)
Medio de cultivo semisólido+6-BAP	1,208 b	(86,43)
Medio de cultivo semisólido+KIN	1,108 d	(79,1)
Medio de cultivo semisólido sin reguladores	1,039 e	(73,3)
±EE	0,012	

a, b. Medias con letras distintas en la misma columna difieren para $p < 0,05$ de acuerdo con Tukey
 VT. Valores transformados mediante $\arcseno(\sqrt{x+1})$. VR. Valores reales. EE. Error estándar

La mayor velocidad de absorción de los nutrientes por los explantes, el ahorro por la eliminación de los gelificantes en el medio de cultivo líquido y la mejor respuesta en el

crecimiento y desarrollo de los explantes, hacen más eficiente el proceso de establecimiento *in vitro* mediante el uso de medios de cultivo líquidos (Etienne y Berthouly, 2002).

No obstante, el medio de cultivo líquido tiene como limitantes, la hiperhidricidad, un serio desorden fisiológico común en muchas plantas fundamentalmente leñosas y la hipoxia. Ambos procesos originan serias afectaciones en el crecimiento de los explantes que puede ocasionar su muerte (Ziv, 1991; Aitken-Christie, 1995; Pérez y *col.*, 1998; Olmos y *col.*, 2004). Sin embargo, la utilización del soporte con papel filtro en este experimento, permitió eliminar la presencia de explantes hiperhidratados o muertos por hipoxia.

La respuesta de los explantes a las características físicas del medio de cultivo se atribuyen principalmente, al potencial hídrico (osmótico y matricial), que incide sobre la disponibilidad de agua por los tallos de las plantas *in vitro* (George, 1996; Majada y *col.*, 1997). El descenso del potencial hídrico del medio de cultivo tiene efectos perjudiciales en las tasas de distintos procesos morfogénicos. Elevadas concentraciones de gelificante modifican drásticamente la absorción de citoquininas (Arnold y Erickson, 1994; Cañal y *col.*, 2001) e iones (Singha y *col.*, 1995; Kitto, 1997). Por lo tanto el uso de medios de cultivo líquidos reduce la incidencia de estos factores, en relación con los medios semisólidos.

En este experimento se tuvo también influencia de la interacción entre el tipo y la concentración de citoquinina sobre las variables número de brotes por explante y longitud de los brotes y no para el número de yemas brotadas.

Para ambas variables, los mejores resultados se lograron con el empleo del 6-BAP, con respecto al uso de kinetina. Los máximos valores en el número de brotes por explante y longitud de los brotes con diferencias significativas con el resto de los tratamientos, se obtuvieron en el tratamiento con $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP. Con este se logró un adecuado balance endógeno de citoquinina, expresado en una mayor longitud de los brotes y mayor número de brotes por explante en esta fase (Tabla 6).

Tabla 6. Influencia de 6-BAP y kinetina (KIN) en el establecimiento *in vitro* de yemas apicales de *Morus alba* L. variedad Criolla a los 28 días de cultivo

Tratamiento	Longitud de los brotes (cm)	No. brotes por explante	
		VT	VR
0,25 mg.L ⁻¹ KIN	2,64 de	1,149 de	1,32
0,50 mg.L ⁻¹ KIN	2,92 cd	1,217 d	1,48
1,00 mg.L ⁻¹ KIN	3,01 c	1,225 d	1,50
2,00 mg.L ⁻¹ KIN	2,43 ef	1,095 e	1,20
0,25 mg.L ⁻¹ 6-BAP	4,10 b	1,536 bc	2,36
0,50 mg.L⁻¹ 6-BAP	4,99 a	1,772 a	3,14
1,00 mg.L ⁻¹ 6-BAP	4,14 b	1,640 b	2,69
2,00 mg.L ⁻¹ 6-BAP	4,01 b	1,493 c	2,23
Control	2,17 f	1,010 e	1,02
±EE	0,10	0,04	

a, b. Medias con letras distintas en la misma columna difieren para $p < 0,05$ de acuerdo con Tukey
 VT. Valores transformados mediante \sqrt{x} . VR. Valores reales. EE. Error estándar

Se conoce que cada especie vegetal requiere la adición de diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento para obtener una respuesta óptima en la brotación de las yemas axilares (Ruziv y Vujovic, 2008; Balakrishnan y col., 2009; Nuri y col., 2010), y que el tipo de citoquinina utilizada en el medio de cultivo tiene un efecto marcado en el establecimiento *in vitro*. Los mejores resultados en el género *Morus* se han obtenido con el empleo del 6-BAP respecto a la kinetina, el tidiazuron y la zeatina, debido probablemente a la mayor especificidad que tiene esta citoquinina para estimular la división celular y el crecimiento de las yemas apicales (Anis y col., 2003; Vijayan y Padmaja, 2005; Sujathamma y col., 2007; Balakrishnan y col., 2009).

Por ejemplo, Lu (2002) observó en *Morus latifolia* Politet, que el 6-BAP fue más efectivo que la kinetina en la inducción de la brotación de yemas axilares y tuvo un papel primordial en su proliferación, expresado en un mayor tamaño y vigor de los brotes. Esta respuesta también coincide con los resultados referidos por Bhau y Wakhlu, (2001), Hassanein y col., (2003) y Kaviashree (2007) y los observados en este experimento.

Otros factores que influyen en las variaciones en la actividad de las diferentes citoquininas en el tejido vegetal son: la tasa diferencial de consumo y la tasa de translocación variable

de nutrientes en las regiones meristemáticas y procesos metabólicos; en las cuales la citoquinina puede ser degradada o conjugada con azúcares o aminoácidos para formar compuestos inertes (Tran Thanh Van y Trinh, 1990; Kaminek, 1992; Ruzic y Vujovic, 2008). Por lo tanto, el tipo y concentración de la citoquinina puede afectar la eficiencia fotosintética y la morfogénesis de la planta (Aloni, 2001; Nagori y Purohit, 2004; Muñiz y col., 2008).

Esta diferencia en la respuesta a diversas concentraciones de 6-BAP está asociada al efecto del genotipo, ya que algunos autores como Vijayan y Padmaja (1999), Habib y col., (2003), Benedetta y col., (2007) y Sujathamma y col., (2007), quienes realizaron estudios en *Morus indica* L. cultivar M-5, *M. alba* L. variedad Kokuso-27, *M. nigra* variedad Fontanarossa nera y *M. multicaulis* variedad Tongxiangqing, respectivamente, indicaron que esta especie es genotipo dependiente. Por su parte, Olmos y col. (2004), Sujathamma y col., (2007) y Ruzic y Vujovic, (2008), indicaron que los tipos de reguladores, sus combinaciones y concentraciones deben ser optimizados para cada especie, genotipo y fase de la propagación *in vitro*.

Sin embargo, a pesar de las diferencias en el uso de diferentes concentraciones de 6-BAP referidas anteriormente, en la mayoría de los casos el uso de esta citoquinina fue necesario para incrementar los valores en la longitud de los brotes y número de brotes por explante y lograr el establecimiento *in vitro*.

Autores como Hassanein y col., (2003) con el empleo de 0,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP lograron el 85% de brotación en yemas apicales de *Morus alba* L. (no se define la variedad). Igualmente, en otras especies, para el caso de la longitud de los brotes, Islam y col., (1993) en *Morus laevigata* Wall, obtuvieron un valor de 5,4 cm para esta variable utilizando 0,56 mg.L⁻¹ de 6-BAP. Lu (2002) indicó un valor de 4,8 cm en la longitud de los brotes con el uso de 1,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP, pero sin diferencias significativas respecto al empleo de 0,5 y 2,0 mg.L⁻¹ de esta citoquinina y establecieron que 0,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP fue suficiente para inducir crecimiento en las yemas apicales de *Morus latifolia* Poilet. En el presente trabajo se obtuvieron resultados similares a los informados por estos autores,

a pesar de trabajar con especies y variedades diferentes.

Respecto al número de brotes por explante, García y col., (2002) señalaron un valor de 2,20 utilizando yemas apicales como explante y 0,05 mg.L⁻¹ de 6-BAP en *Morus alba* L. variedad Tigreada, el cual fue inferior al obtenido en el presente trabajo (3,14). Asimismo, Vijayan y Padmaja (1999) indicaron los mejores resultados con 2,0 mg.L⁻¹ 6-BAP, al comparar el empleo de 6-BAP y kinetina. Habib y col., (2003) señalaron la misma respuesta, pero los máximos valores los obtuvieron con 1,0 mg.L⁻¹ de esta citoquinina.

De acuerdo con Delgado (2000), Olmos y col., (2004), Osterc y col., (2005) y Muñiz y col., (2008), la citoquinina que más se ha utilizado en el establecimiento y multiplicación de especies leñosas es el 6-BAP, debido a su mayor efectividad en los procesos de división y elongación celular de estas especies, lo cual lo corroboraron Zaman y col., (1992), Habib y col., (2003), Toro (2003), Hassanein y col., (2003), Abdelnour y Muñoz (2005) y los resultados obtenidos en este experimento en algunas especies del género *Morus* al comparar el 6-BAP respecto a la kinetina.

Los resultados de los acápite anteriores demuestran que se puede lograr el establecimiento *in vitro* de morera con un adecuado manejo de las concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión de los explantes en la desinfección, así como el uso del 0,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP en el medio de cultivo en estado líquido con soporte de papel filtro. Con lo anterior se cumplió el propósito de esta fase que es establecer el cultivo en condiciones asépticas y fisiológicamente viables para iniciar el proceso de multiplicación *in vitro*, debido en gran medida al estado fisiológico que presentaba el material vegetal de partida, lo cual corrobora la importancia del origen del explante para su posterior respuesta *in vitro*.

4.2. Fase de multiplicación

4.2.1. Efecto de 6-BAP y ANA sobre la proliferación de brotes de morera

Con el empleo de 6-BAP solo o combinado con ANA en el medio de cultivo se logró una mejor respuesta sobre la proliferación de los brotes de morera en la fase de multiplicación,

con diferencias significativas en relación con el tratamiento sin reguladores de crecimiento en todas las variables evaluadas. Con estos resultados se evidencia la necesidad del uso de tales sustancias para mejorar la proliferación de los brotes de en esta fase. Se logró la mayor respuesta en el incremento de los valores de todas las variables, al combinar 0,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP con 0,5 mg.L⁻¹ de ANA (Tabla 7, Figura 5).

Tabla 7. Influencia del 6-BAP solo o combinado con ANA sobre la proliferación de brotes de *Morus alba* variedad Criolla en fase de multiplicación a los 28 días de cultivo

Tratamiento (mg.L ⁻¹)	Longitud de los brotes (cm)	No. brotes por explante		Coeficiente de multiplicación
		VT	VR	
Control	1,03 i	1,00 i	1,00	1,32 j
0,25 6-BAP	3,18 h	1,31 h	1,71	2,67 i
0,50 6-BAP	3,70 g	1,47 f	2,15	3,10 gh
1,00 6-BAP	3,13 h	1,37 g	1,88	2,70 hi
0,25 6-BAP+0,25 ANA	4,25 ef	1,73 d	3,00	4,50 e
0,25 6-BAP+0,50 ANA	4,00 fg	1,58 e	2,50	3,75 f
0,25 6-BAP+1,00 ANA	3,85 g	1,50 f	2,25	3,38 fg
0,50 6-BAP+0,25 ANA	6,00 b	1,98 b	3,91	6,00 c
0,50 6-BAP+0,50 ANA	7,13 a	2,31 a	5,33	8,00 a
0,50 6-BAP+1,00 ANA	5,70 b	2,00 b	4,00	6,63 b
1,00 6-BAP+0,25 ANA	5,11 c	1,85 c	3,43	5,25 d
1,00 6-BAP+0,50 ANA	4,75 d	1,73 d	3,00	4,50 e
1,00 6-BAP+1,00 ANA	5,03 cd	1,69 d	2,85	4,28 e
±EE	0,12	0,022		0,14

a, b. Medias con letras distintas en la misma columna difieren para p<0,05 de acuerdo con Tukey
VT: valores transformados mediante \sqrt{x} . VR: valores reales. EE: error estándar.

El papel de las citoquininas en la fase de multiplicación es importante para lograr la proliferación de las yemas axilares, a partir de la función determinante que desempeñan éstas en el proceso de división celular. No obstante, en algunos casos es necesaria la adición de auxinas para garantizar un adecuado balance endógeno en los tejidos y promover el crecimiento y diferenciación de los brotes, así como estimular el incremento de las tasas de multiplicación. Las auxinas promueven la actividad del cambium en el

tejido vascular, ya que estimulan la división celular, la expansión de las yemas por su movimiento hacia los tallos y la formación de tejido vascular secundario, lo que induce finalmente la brotación lateral (Sujathamma y col. 2007; Robert y Friml, 2009; Nuri y col. 2010).

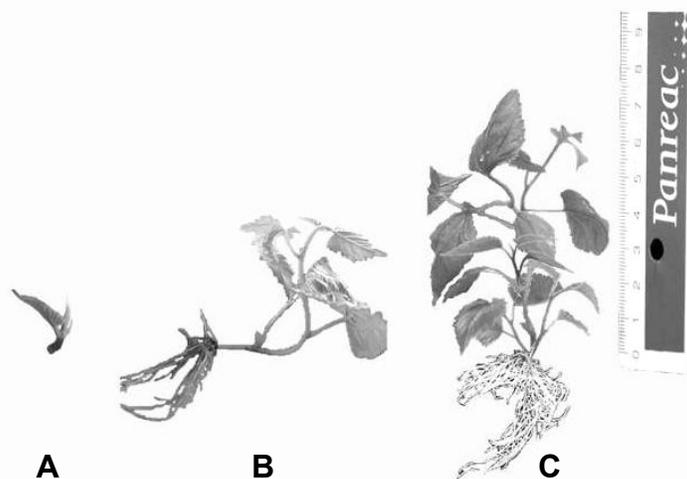


Figura 5. Caracteres morfológicos de las plantas obtenidas en la fase de multiplicación *in vitro* de *Morus alba* var. Criolla. (A) Sin reguladores de crecimiento, (B) con $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP y (C) con $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ 6-BAP más $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA.

Es muy frecuente en los protocolos de propagación *in vitro* el empleo de citoquininas solas o combinadas y en muchos casos interactuando con auxinas que permitan una eficaz multiplicación y elongación de los brotes. Dentro de las citoquininas una de las más usadas y comúnmente evaluadas en especies leñosas es el 6-BAP (Rodríguez y col., 2003b; Sánchez y col. 2004; Uribe y Cifuentes, 2004; Martínez y col., 2005a, Bhalla y col., 2009).

Al respecto, Pérez (1997) indica que la adición de citoquininas al medio de cultivo estimula la proliferación de las yemas axilares y la acción de la auxina a bajas concentraciones está dada en atenuar el efecto depresivo de las altas concentraciones de 6-BAP sobre la elongación de los brotes y poder restablecer, posteriormente, su crecimiento normal. Por otra parte, Zhao, (2008) y Nuri y col., (2010) señalaron que al aplicar reguladores de crecimiento (auxina o citoquinina) al medio de cultivo, debe existir

un balance entre ambos, ya que al aumentar la cantidad de citoquinina con respecto a la auxina se induce la formación de brotes. En este sentido, Nirmalakumari (2006) y Sujathamma *y col.*, (2007) señalaron que las necesidades de citoquinina (tipo y concentración) son variables y dependen del contenido endógeno de cada especie.

El balance auxina citoquinina es determinante en el coeficiente de multiplicación, por lo que si se logra, es posible alcanzar altas tasas de proliferación aumentando la efectividad del método de propagación como lo indican Nirmalakumari, (2006), Sujathamma *y col.*, (2007) y Balakrishnan *y col.*, (2009). Además, es muy importante tomar en cuenta el patrón de crecimiento de cada especie en cuestión al momento de emplear reguladores del crecimiento durante las diferentes fases del proceso de propagación *in vitro* de las especies leñosas.

Por otro lado, Bhau y Wakhlu (2001), Vijayan y Padmaja, (2005) y Benedetta *y col.*, (2007) en *Morus spp.*, señalaron que un balance adecuado entre auxinas y citoquininas fue necesario para la formación de plantas a partir de meristemas, ápices o yemas, el cual estuvo determinado por las concentraciones endógenas de estos reguladores del crecimiento presentes en los explantes y consideraron que si la relación auxina citoquinina en el medio de cultivo era favorable a la segunda, había la formación de brotes y lo contrario, promovió el enraizamiento.

De acuerdo con Arredondo (2000), Thomas (2002) y Dandin y Naik, (2004), para obtener brotes de mayor tamaño es necesario adicionar al medio de cultivo bajas concentraciones de citoquininas, ya que con esto se logra disminuir la división celular y favorecer la elongación del tejido por la acción de las auxinas, lo cual fue confirmado por Nirmalakumari, (2006) y Kavyashree, (2007) en *Morus alba* L. (no especifica variedad) y *Morus indica* L. variedad S54, respectivamente, quienes informaron que una mayor concentración de citoquinina indujo la formación de brotes más pequeños.

Esta misma respuesta la señalaron Vijayan y Padmaja (2002), Habib *y col.*, (2003) y Balakrishnan *y col.*, (2009), quienes indicaron que los mejores resultados en la multiplicación *in vitro* de morera los obtuvieron al utilizar 6-BAP en el medio de cultivo. Sin

embargo, Jain y col., (1996), Sahoo y col., (1997), Anis y col., (2003) y Sujathamma y col., (2007) establecieron que es necesario combinar el 6-BAP con ANA, para hacer más eficiente el proceso de multiplicación de la morera, ya que con ello obtuvieron los mejores resultados en el número de brotes por explante y coeficiente de multiplicación. Los resultados de este experimento coincidieron con los referidos por dichos autores.

Los valores del coeficiente de multiplicación obtenido en este trabajo son similares a los indicados por Vijayan y Padmaja, (2005) y Hassanein y col., (2003), quienes usaron 0,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP en medio de cultivo MS y establecieron que esta concentración de 6-BAP favoreció la brotación de las yemas axilares y el crecimiento de los brotes regenerados al emplear segmentos nodales como explantes en tres variedades de *Morus indica* L. (M-5, S-36 y S-13) y en *Morus alba* L. variedad China White. Esto es un indicador de una mejor respuesta morfogénica de la morera a éste tipo y concentración de reguladores del crecimiento expresada en un mayor coeficiente de multiplicación.

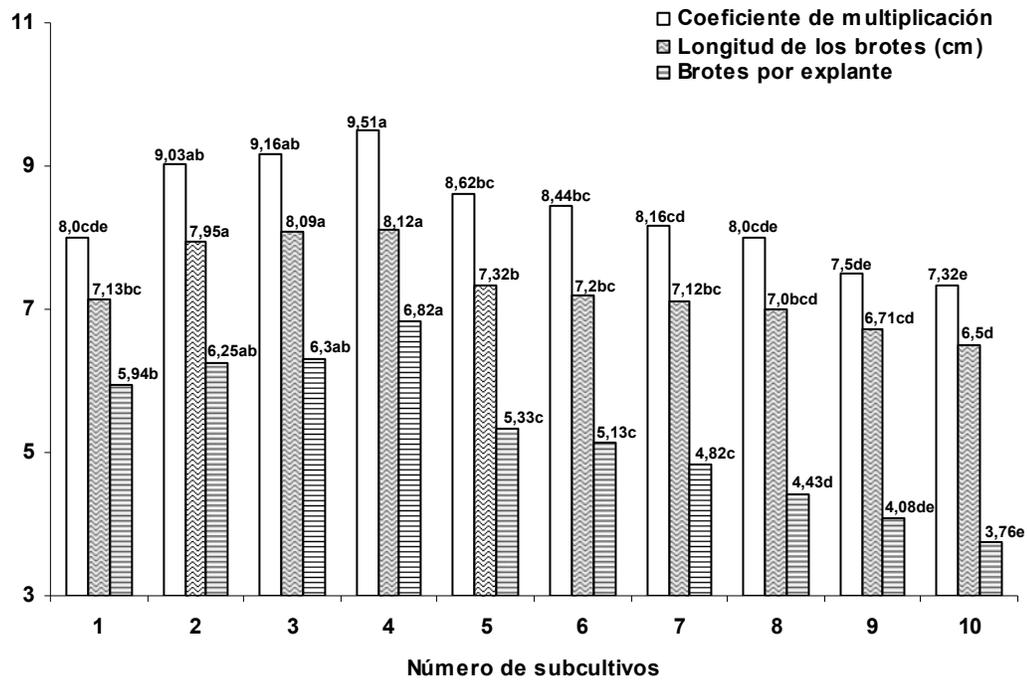
En otras especies leñosas, algunos autores como Tacoronte y col., (2004) y Larson y col., (2006) obtuvieron los mejores resultados en la fase de multiplicación con el empleo de 6-BAP combinado con ANA en el medio de cultivo.

Los resultados de este acápite mostraron nuevamente el papel determinante de la citoquinina 6-BAP en la proliferación de brotes en esta especie vegetal y que su combinación con el ANA fue más efectiva para incrementar la longitud de los brotes, el número de brotes por explante y el coeficiente de multiplicación en relación con su empleo sin auxina.

4.2.2 Influencia del número de subcultivos sobre la multiplicación de morera

El número de subcultivos tuvo influencia sobre las variables evaluadas en este experimento. Se observó un incremento en el coeficiente de multiplicación, la longitud de los brotes y el número de brotes por explante hasta lograr valores máximos de 9,51, 8,12 cm y 6,82 para cada variable, respectivamente en el cuarto subcultivo. A partir de este los valores comenzaron a disminuir hasta el décimo subcultivo. Sin embargo, no se

encontraron diferencias significativas entre los subcultivos dos, tres y cuatro en las variables evaluadas (Figura 6).



a,b. Medias con letras distintas en la misma variable difieren para $p < 0,05$ de acuerdo con Tukey
 MG \pm EE (coeficiente de multiplicación) = 8.37 ± 0.27 . Longitud de los brotes = 7.31 ± 0.2 . Brotos adventicias = 5.29 ± 0.19

Figura 6. Influencia del número de subcultivos sobre el coeficiente de multiplicación, longitud de los brotes y número de brotes por explante de *Morus alba* L. variedad Criolla.

Es conocido el efecto que tiene la edad *in vitro* sobre la respuesta morfogénica de los tejidos. En la medida que aumenta el número de subcultivos de los explantes expuestos a concentraciones estables de citoquininas, se produce un efecto de habituación (Villalobos y Thorpe, 1993; Rout y Das, 1997) y los tejidos comienzan a producir ciertos niveles del regulador del crecimiento. Por lo tanto, después de varios subcultivos estas concentraciones comienzan a inhibir el proceso de diferenciación celular y afectar las tasas de multiplicación. Por ello, se requiere reducir el número de subcultivos, adicionar auxinas para lograr un adecuado balance, utilizar medio de cultivo libre de reguladores del crecimiento o realizar una propagación en cascada, a través de la cual se elevan y reducen consecutivamente los niveles de citoquininas en cada subcultivo (Vardja y Vardja, 2001; Vijayan y Padmaja 2005; Hamad y Taha, 2008).

Además, se debe considerar que conforme aumenta el tiempo de cultivo, se incrementan las concentraciones endógenas de los reguladores de crecimiento, lo cual produce cambios en el crecimiento y senescencia de los brotes (Phillips, 2004; Malá y col., 2005), así como disminuye la elongación de los brotes, por lo que la concentración de los reguladores de crecimiento y el tiempo de cultivo dependen de cada especie y genotipo (Uribe y Cifuentes, 2004; Ruzic y Vujovic, 2008).

Algunos autores como Bhau y Wakhlu, (2003) y Benedetta y col., (2007) en *Morus alba* L., *Morus nigra* L. y *Morus multicaulis* Perr. observaron un incremento gradual en la longitud de los brotes, número de brotes por explante y coeficiente de multiplicación hasta el cuarto subcultivo pero sin diferencias significativas, a partir del cual, los valores disminuyeron.

Los resultados de este experimento fueron superiores a los obtenidos por Habib y col., (2003) en *Morus alba* L. variedad Kokuso-27, quienes señalaron un valor de 7,0 en el coeficiente de multiplicación. Algunos autores como Vijaya y Chitra (2002), Bhau y Wakhlu, (2003) y Olmos y col., (2004) establecieron que la respuesta de los explantes al cultivo *in vitro* depende grandemente del genotipo evaluado. Además, señalaron que se podían multiplicar los brotes durante un número de subcultivos indefinido y mantener el coeficiente de multiplicación estable a través del tiempo, pero que estos brotes deben originarse siempre a partir de yemas axilares.

Por otro lado, en la variable número de brotes por explante, Bhau y Whakhlu, (2003) en dos variedades de *Morus multicaulis* Perr. observaron un aumento en esta variable hasta el quinto subcultivo a partir del cual disminuyó significativamente. Este mismo resultado lo obtuvieron Pattnaik y col., (1996) en *Morus Australis* Poir syn. y *Morus acidosa* Griff. y Pattnaik y Chand, (1997) en *Morus cathayana* Hemsl., *Morus lhou* Koiz. y *Morus serrata* Roxbdel.

Por su parte, Vijayan y Padmaja (2002) en *Morus alba* L. variedad China White y *Morus indica* L., variedades M-5, S-36 y S-13, observaron un incremento en el número de brotes por explante conforme aumentaba el número de subcultivos e indicaron el máximo valor

en el décimo subcultivo. Sin embargo, en *Morus laevigata* Wall., Hossain y col., (1992) observaron un incremento en la tasa de multiplicación hasta el séptimo subcultivo la cual disminuyó posteriormente.

En otras especies leñosas como *Hibiscus elatus* Sw, Trocones (2000) obtuvo un incremento en el coeficiente de multiplicación hasta el quinto subcultivo, el cual descendió posteriormente hasta el décimo. Resultados similares indican otros autores como Rout y col., (2000) en *Lawsonia inermis* L., Sotolongo y col., (2003) en *Psidium salutare* L. y Osterc y col. (2005) en *Castanea sativa* Mill.

En este experimento se observó la formación de un callo en la base de los explantes a partir del quinto subcultivo y aunque no se realizaron estudios histológicos para definir el origen de estos, los brotes con callos en la base no se consideraron como material de partida para cada uno de los subcultivos posteriores, por lo que fue otro factor que influyó en la disminución de los valores del coeficiente de multiplicación a partir del quinto subcultivo; además del descenso en el número de brotes por explante y la longitud de los brotes.

Por otro lado, en los brotes con callo no hubo formación de raíces. Al respecto, Pattnaik y Chand (1997), Lu (2002), Vijayan y Padmaja (2002) y Hassanein y col. (2003) establecieron que la formación de callo durante la fase de multiplicación es un fenómeno muy común en el género *Morus*, el cual interfiere en la conexión entre el brote y la raíz, por lo tanto el enraizamiento se hace más difícil (Jain y col., 1990; Yadav y col., 1990; Olmos y col., 2004; Vijayan y Padmaja, 2005).

Por su parte, Vijayan y Padmaja (2002) y Bhau y Wakhlu (2003) refirieron un comportamiento similar al observado en el presente estudio, al señalar un descenso en el coeficiente de multiplicación y el desarrollo de un callo en la base de los brotes a partir del quinto subcultivo en *Morus indica* L. (variedades M-5, S.13, S-36), *Morus alba* L. (variedades Chinese White, Kokuso-27, Ichinosa) y *Morus multicaulis* Perr. (variedades Goshorami y Rokokuyaso). Estos autores atribuyeron este comportamiento a la continua exposición de los explantes al 6-BAP durante la inducción y proliferación de los brotes en

Morus, lo que provocó la acumulación de esta citoquinina y consecuentemente la inhibición de su crecimiento.

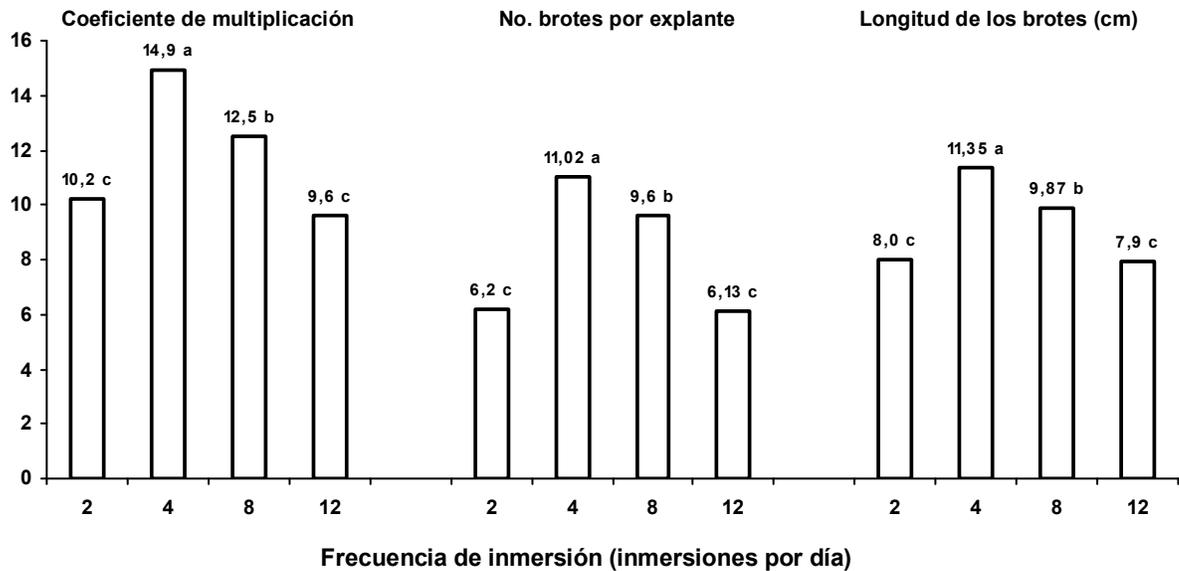
En la multiplicación *in vitro* de *Morus alba* variedad Criolla en medio de cultivo semisólido no solo influyó el balance citoquinina-auxina, sino también el número de subcultivos y el efecto principal, considerando que el objetivo de esta fase es la producción del mayor número posible de plantas a partir de un explante, fue en el incremento del coeficiente de multiplicación hasta el cuarto subcultivo. No obstante, la formación de callo, la disminución en la longitud de los brotes y del número de brotes por explante, así como la ausencia de sistema radical determinaron que en esta variedad de *Morus alba* L., se deben realizar cuatro subcultivos para lograr la mayor longitud de los brotes, mayor cantidad de brotes por explante, brotes con raíces y coeficiente de multiplicación. Con cuatro subcultivos es posible producir hasta 4129 explantes por cada explante inicial y se puede evitar la aparición de variabilidad somaclonal del material vegetal propagado al no utilizar los brotes con formación de callo.

4.2.3. Multiplicación de morera en Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)

4.2.3.1 Efecto de la frecuencia de inmersión

Los resultados de este experimento mostraron que la frecuencia de inmersión tuvo una influencia significativa sobre las variables evaluadas. Se observaron valores máximos en el número de brotes, la longitud de los brotes y el coeficiente de multiplicación, con diferencias significativas con los restantes tratamientos, con cuatro inmersiones por día. Con el empleo de los SIT se logró aumentar el coeficiente de multiplicación de 10,2 a 14,9 al cambiar la frecuencia de inmersión de dos a cuatro inmersiones por día, además de un incremento en 5,3 unidades con respecto al tratamiento con 12 inmersiones por día donde se obtuvo el valor más bajo (Figura 7).

Se debe destacar que a diferencia de otras especies leñosas, no se evidenció la presencia de plantas con síntomas de hiperhidricidad en los tratamientos evaluados, lo cual es un indicador importante de la calidad de las plantas obtenidas.



MG±EE (Coeficiente de multiplicación) = 11,8±0,5. No. brotes por explante = 8,23±0,31. Longitud de los brotes = 9,28±0,2
 a, b, Medias con letras distintas en cada variable difieren para p<0,05 según la prueba de Tukey

Figura 7. Influencia de la frecuencia de inmersión de los segmentos nodales de *Morus alba* L. variedad Criolla en la respuesta *in vitro* después de 28 días de cultivo en SIT

Dentro de los factores que más se han estudiado al emplear los SIT para la multiplicación de los tejidos vegetales, se encuentra la frecuencia y el tiempo de inmersión. Sin embargo, en este trabajo de investigación se hizo un mayor énfasis en la frecuencia de inmersión, pues muchos autores han demostrado (en dependencia del tipo de frasco empleado), que el tiempo aunque es un factor determinante en cada especie vegetal, no debe exceder de uno o dos minutos en las especies leñosas, para evitar la presencia de brotes con síntomas de hiperhidricidad (Berthouly y col., 1995; Cabasson y col., 1997; Etienne y col., 1997a; Etienne y col. 1997b; Etienne-Barry y col., 1999) y es suficiente para producir un incremento en la actividad de la superóxido dismutasa y una peroxidación de los lípidos que desaparecen al terminar la fase de inmersión, con lo cual se evita la muerte celular por estrés oxidativo inducido por el tiempo prolongado de exposición de los explantes al medio de cultivo líquido (Martre y col., 2001; Berg y col., 2002; Taiz y Zeiger, 2002; Colmenares y Giménez, 2003; Berthouly y Etienne, 2005; Nelson y Cox, 2005).

Los resultados de este estudio pueden también estar relacionados a que en los SIT, a diferencia de los sistemas de cultivo estáticos utilizados comúnmente en la propagación *in vitro*, el medio de cultivo solamente está en contacto con la planta un corto periodo de tiempo, con la particularidad que toda la planta entra en contacto con el mismo y finalmente queda cubierta por una fina película de medio de cultivo. Los nutrientes contenidos del medio de cultivo son absorbidos directamente a través de varias zonas de la planta y por lo tanto, el estímulo del crecimiento es mucho mayor. La disminución de los valores de las variables a partir del tratamiento con cuatro inmersiones está relacionada con el contacto más frecuente de los explantes con el medio de cultivo, lo que produce luego de finalizada la inmersión, un incremento en la producción de dióxido de carbono, así como una mayor actividad de enzimas relacionadas con el estrés oxidativo, lo cual provoca una menor asimilación de los nutrientes disponibles en el medio de cultivo (Piao y col., 2003).

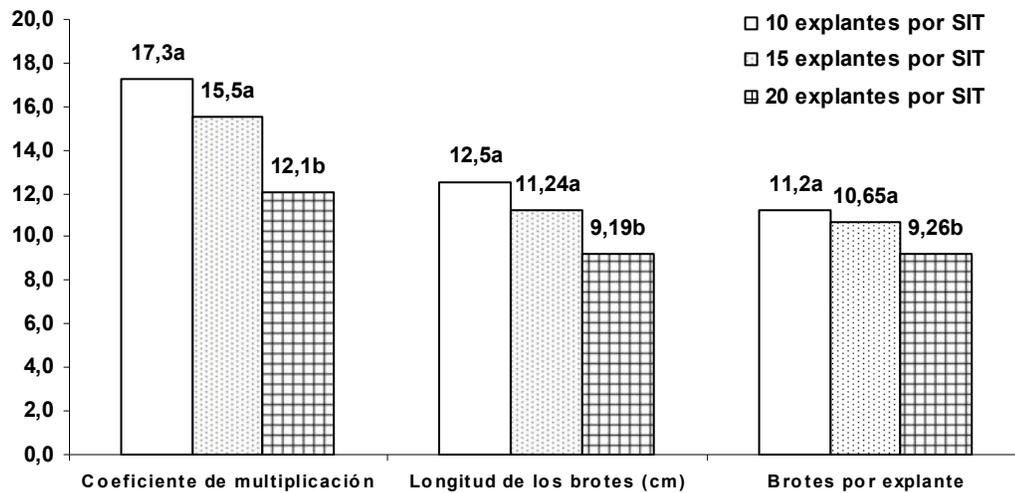
La frecuencia de inmersión está muy relacionada con la respuesta morfogénica de los tejidos *in vitro*, sobre todo porque interviene en las relaciones hídricas y el intercambio gaseoso de los mismos y varía de una especie a otra en dependencia del tipo de tejido que se utilice (Kandasamy y col., 2001; Palhares y col., 2004).

En este sentido, Castro y González (2002) establecieron la mejor frecuencia de inmersión (cuatro inmersiones por día) en base al menor porcentaje de hiperhidricidad en *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, la cual fue similar a la obtenida en este experimento, pero sin evidencia alguna de este fenómeno fisiológico.

4.2.3.2 Influencia de la densidad de explantes por SIT

Se observó un efecto significativo de la densidad de explantes por SIT sobre la longitud de los brotes, número de brotes por explante, coeficiente de multiplicación, masa fresca y masa seca. En el caso de las variables longitud de los brotes, número de brotes por explante y coeficiente de multiplicación, se observó una tendencia a la disminución en los valores de las mismas en la medida que se empleó una mayor densidad inicial de

explantes por frasco de cultivo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las densidades de 10 y 15 explantes por SIT (Figura 8).



MG±EE (Coeficiente de multiplicación) = 14,97±0,71. Longitud de brotes = 10,98±0,44. Brotes por explante = 10,37±0,19
a, b. Medias con letras distintas en cada variable difieren para p<0,05 de acuerdo con Tukey

Figura 8. Influencia de la densidad de explantes en los Sistemas de Inmersión Temporal sobre la multiplicación de brotes de *Morus alba* L. variedad Criolla.

De igual forma, en los resultados del análisis en las variables masa fresca y masa seca no se observaron diferencias significativas entre las densidades de 10 y 15 explantes por SIT, con valores máximos en la primera de ellas de 1,48 y 0,16 g por brote respectivamente. Sin embargo, sí fueron evidentes las diferencias entre los tratamientos de 10 y 15 explantes respecto al de 20 (Figura 9).

Los resultados de este estudio pudieran, además, relacionarse con la competencia que establecen los explantes por la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo, ya que se parte de un volumen estable del mismo y por lo tanto, en aquellos tratamientos en los cuales se utilizaron menos explantes, éstos disponían de mayor cantidad de nutrientes para su crecimiento, resultados que fueron similares a los obtenidos por Castro y González (2002) y Murch y col., (2004) en *Eucalyptus grandis* Hill ex Maden.

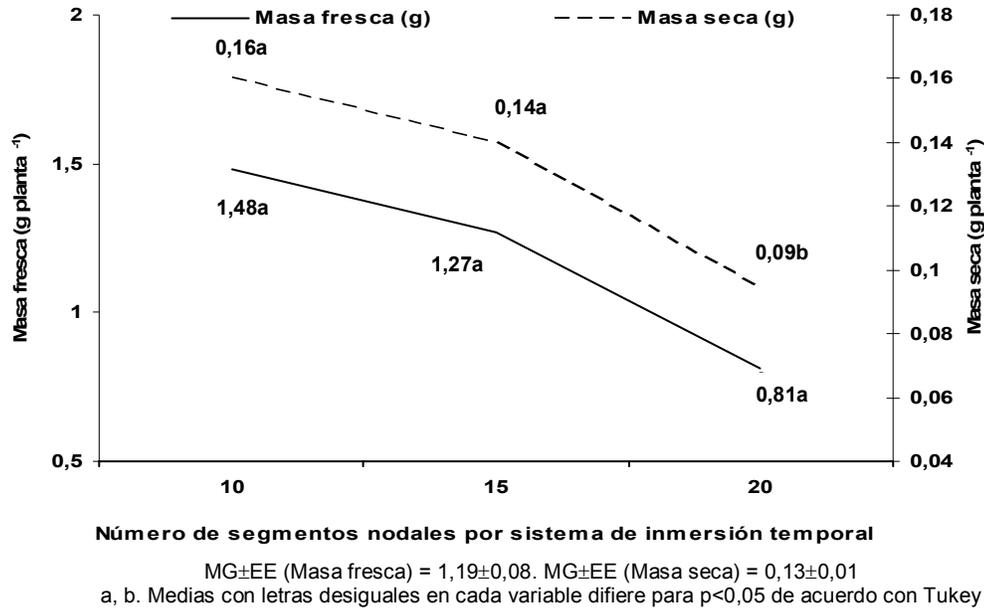


Figura 9. Efecto de la densidad de explantes en los Sistemas de Inmersión Temporal sobre la masa fresca y seca de los brotes de *Morus alba* L. variedad Criolla.

En la literatura científica aparecen muchos trabajos sobre el tiempo y la frecuencia de inmersión, así como el volumen de medio de cultivo por explante en los SIT en diferentes especies de plantas. Sin embargo, sólo existen algunos estudios sobre el efecto que tiene la densidad de explantes por frasco sobre el crecimiento de los tejidos (McAlister y col., 2005; Salazar y Hoyos, 2007). Este es un aspecto importante a considerar, sobre todo cuando estas tecnologías tendrán una aplicación comercial, por lo tanto los indicadores de eficiencia también juegan un papel relevante (Mehrotra y col., 2007).

En los SIT, debido al mayor volumen en relación con los frascos de cultivo empleados en la propagación convencional, una menor densidad de explantes pudiera ocasionar la subutilización de los SIT, de las cámaras de cultivo y una pérdida del medio de cultivo. Este caso sería al emplear la densidad inicial de 10 explantes. Por otro lado, densidades elevadas podrían provocar una baja disponibilidad de oxígeno en el interior del recipiente, un engrosamiento excesivo, formación de callosidades de consistencia acuosa en la superficie del explante, cambios de coloración, estrangulamiento en la zona apical y disminución en la respuesta morfogénica de los tejidos, de ahí la importancia de evaluar

experimentalmente este factor aprovechando la capacidad de los recipientes empleados en cada especie vegetal (Pérez, 2001; Hvoslef-Eide y col., 2003; Berthouly y Etienne, 2005). Por ello, en el presente estudio se seleccionó como mejor tratamiento la densidad de 15 explantes por SIT para *Morus alba* L. variedad Criolla.

En los SIT se conjugan varios factores que permiten la renovación de la atmósfera, un aporte más eficiente en los elementos nutritivos, la eliminación de sustancias tóxicas, mejor intercambio gaseoso y por lo tanto condiciones más favorables del microambiente *in vitro*, para el crecimiento de los explantes (Hvoslef-Eide y col., 2003; Basail, 2005). Estas condiciones provocan cambios fisiológicos favorables en la planta, una mayor estimulación de las yemas para la formación y crecimiento de brotes, así como un aumento considerable en el coeficiente de multiplicación y mejor calidad de los brotes en términos de una mayor producción de masa seca y longitud de los brotes; por lo que debe tomarse en cuenta la densidad de explantes en cada especie vegetal (Berthouly y Etienne, 2005).

Palhares y col., (2004) en *Eucalyptus urograndis* (*E. grandis* x *E. urophylla*) observaron valores de 1,45 cm y 0,05 g.brote⁻¹ en la longitud de los brotes y masa seca, respectivamente y consideraron estas variables como las más importantes en la fase de multiplicación con el uso de los SIT, en plantas *in vitro* que fueron llevadas directamente a la fase de aclimatización. De igual forma, en el presente trabajo, las plantas obtenidas con el empleo de los SIT en fase de multiplicación se llevaron a aclimatización tomando en cuenta no sólo la longitud de los brotes y la masa seca por brote sino también la presencia de sistema radical.

Por su parte Castro y González (2002) señalaron la importancia de la masa seca como un indicador de la calidad de los brotes, ya que se compone principalmente de lignina y polisacáridos en la pared celular, además de componentes del protoplasma como proteínas, lípidos, aminoácidos, ácidos orgánicos y algunos inorgánicos como el potasio.

Otros autores señalaron también un aumento en la eficiencia biológica y productiva del material vegetal propagado en los SIT, debido al aumento de los coeficientes de

multiplicación, la obtención de plantas de mayor calidad, mejores rendimientos en comparación con los medios de cultivo estáticos, así como una reducción en los costos de producción (Lorenzo y col., 2001; Castro, 2001; Basail, 2005 y Cabrera y col., 2005).

Por otro lado, Bernal (2001) y Murch y col. (2004) señalaron que los SIT constituyen una herramienta novedosa para el cultivo de tejidos debido a que reduce el manejo de los explantes, simplifica el cambio de medio de cultivo, aumenta el grado de proliferación y aumenta la masa seca de los mismos, esta última variable influye de forma significativa en la aclimatización y la producción en el campo.

Con los experimentos realizados en esta fase se logró un incremento del coeficiente de multiplicación (de 9,51 en medio de cultivo semisólido a 15,5 en SIT) y en la calidad de los brotes *Morus alba* L. variedad Criolla con cuatro inmersiones por día y una densidad de 15 explantes por SIT. No se observó la formación de callo en ninguno de los experimentos realizados.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la fase de multiplicación, en la cual las plantas procedentes tanto de medio de cultivo semisólido como de inmersión temporal desarrollaron un promedio de 10 hojas, tuvieron formación de raíces y lograron una longitud promedio de 8,12 y 11,24 cm, respectivamente, con cuatro subcultivos, la fase de enraizamiento no fue necesaria, por lo que las plantas *in vitro* se llevaron directamente a aclimatización (Figura 10).

De esta forma se hace más eficiente la propagación *in vitro* de *Morus alba* L. variedad Criolla, debido a que se elimina la fase de enraizamiento que es la más voluminosa dentro del proceso de propagación y que puede limitar la capacidad de producción de un laboratorio comercial.

En la literatura científica consultada sobre el cultivo *in vitro* de morera no se encontraron estudios en los que se haya eliminado la fase de enraizamiento *in vitro*, ya que en la mayoría de ellos utilizan el ácido 2,4-diclorofenoxiacético, ácido indolbutírico, ácido indolacético y el ácido naftalenacético como principales reguladores de crecimiento para inducir la formación de raíces y lo realizan como una fase posterior a la fase de

multiplicación de los brotes (Benedetta y col., 2007; Balakrishnan y col., 2009; Pradhan y col., 2010).



Figura 10. Plantas de *Morus alba* variedad Criolla procedentes de medio de cultivo semisólido (SS) y Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) con cuatro subcultivos, listas para la fase de aclimatización.

Con estos resultados se demuestran las ventajas del uso de los Sistemas de Inmersión Temporal en la fase de multiplicación *in vitro* de *Morus alba* variedad Criolla, para aumentar la disponibilidad y calidad de los explantes en el proceso de propagación *in vitro*.

4.3. Aclimatización de plantas *in vitro*

4.3.1. Influencia del tipo de sustrato sobre la aclimatización de plantas obtenidas mediante el cultivo *in vitro*

El tipo de sustrato empleado tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas *in vitro* y consecuentemente en su aclimatización bajo condiciones de casa de cultivo. Los resultados mostraron un comportamiento significativamente superior de las plantas obtenidas por cultivo *in vitro*, con relación a las procedentes de estacas. El máximo valor en todas las variables evaluadas se logró con las plantas *in vitro* procedentes de los SIT y la combinación de humus de lombriz (85%) y zeolita (15%), el cual superó de forma significativa a los restantes tratamientos (Tabla 8, Figura 11).

Tabla 8. Influencia del tipo de sustrato sobre la aclimatización de las plantas *in vitro* de *Morus alba* L. variedad Criolla a los 45 días.

Tratamiento	Supervivencia (%)		Altura de la planta (cm)	No. de hojas
	VT	VR		
PSS en humus de lombriz al 100%	1,303 d	92,0	26,5 f	7,0 f
PSIT en humus de lombriz al 100%	1,332 c	93,4	31,7 c	10,1 c
PE en humus de lombriz al 100%	1,244 e	88,7	16,3 i	5,0 i
PSS en humus de lombriz 50% y zeolita 50%	1,323 cd	93,0	28,7 e	8,2 e
PSIT en humus de lombriz 50% y zeolita 50%	1,369 b	95,0	33,5 b	11,3 b
PE en humus de lombriz 50% y zeolita 50%	1,251 e	89,1	18,4 h	5,9 h
PSS en humus de lombriz 85% y zeolita 15%	1,369 b	95,0	30,2 d	9,8 d
PSIT en humus de lombriz 85% y zeolita 15%	1,403 a	96,2	35,3 a	13,6 a
PE en humus de lombriz 85% y zeolita 15%	1,266 e	90,0	20,1 g	6,7 g
\pm EE	0,008		0,35	0,08

a, b. Medias con letra distinta en la misma columna difieren para $p < 0.05$ de acuerdo con Tukey
 VT. Valores transformados mediante arcoseno ($\sqrt{x+1}$). VR. Valores reales. EE. Error estándar
 PSS. Plantas procedentes de medio de cultivo semisólido.
 PSIT. Plantas procedentes de Sistemas de Inmersión Temporal
 PE. Plantas procedentes de estacas

El intercambio gaseoso o enriquecimiento del aire *in vitro* que ocurre en los sistemas de inmersión temporal, se le considera un elemento importante (Nguyen y col., 2001) o factor clave (Shim y col. 2003) en la aclimatización de las plantas, debido a la estimulación de cambios significativos en el crecimiento, anatomía y fisiología de las plantas que persisten aún después del trasplante.

En la variable supervivencia las plantas provenientes del cultivo *in vitro*, tanto de medio de cultivo semisólido como de los sistemas de inmersión temporal, fueron superiores en relación con las empleadas como control. Estos resultados indicaron que el manejo realizado a las plantas *in vitro* bajo condiciones de casa de cultivo garantizó una alta supervivencia, al evitar el exceso de transpiración por la disminución de la intensidad de luz solar incidente y mantener alta la humedad relativa (85-90%) hasta que estas lograron un adecuado desarrollo, teniendo en cuenta que la fase de aclimatización es la más crítica sobre todo en especies leñosas, como lo indicaron (Maciel y col., 2002; García y col., 2004; Martínez y col., 2005b).

Por otro lado, las plantas obtenidas de los SIT contienen más reservas de energía respecto a las de medio de cultivo semisólido lo cual es un factor importante durante su crecimiento y desarrollo *ex vitro*. Lo anterior se debe mayor intercambio gaseoso durante el cultivo *in vitro*, absorción de agua y nutrientes por las plantas y eliminación de sustancias tóxicas lo que proporciona un aumento en la masa fresca y seca de las plantas y se manifiesta en un mayor crecimiento en la fase de aclimatización (Lucchesini y col. 2001; Shim y col. 2003; Paz y Villegas, 2009).

Al evaluar el comportamiento de las plantas procedentes de los SIT comparadas con las obtenidas en medio de cultivo semisólido, Lorenzo y col. (2001), Rodríguez y col., (2003b) y Paz y Villegas (2009), indicaron un mayor crecimiento y desarrollo de éstas en condiciones *ex vitro* por lo tanto, un mayor éxito en la aclimatización y no encontraron diferencias fenotípicas con las plantas derivadas del método convencional de propagación en las especies que estudiaron.

Estos autores indicaron, además, que la mayor eficiencia en la aclimatización de las plantas cultivadas en los Sistemas de Inmersión Temporal respecto a las obtenidas en medio de cultivo semisólido se debe a una mayor actividad fotosintética y acumulación de biomasa observada en éstas plantas una vez transferidas a condiciones *ex vitro*.

Dado que entre los factores que mayor influencia tienen en la aclimatización de las plantas *in vitro* se encuentran el tipo y composición del sustrato, el cual determina una adecuada retención de humedad y componentes químicos para proveer a la planta de agua y nutrientes, y al mismo tiempo ejerce una influencia significativa en la arquitectura del sistema radical influenciando el estado nutricional y la translocación de agua en las plantas (De Rezende y col., 2007; Morales y col., 2008) se hace necesario prestar especial atención a su selección y uso.

Algunos autores como Agramonte (2000), Jiménez y col., (2001) y Díaz y col., (2004), indicaron que el humus de lombriz como componente del sustrato tiene características necesarias para hacer más eficiente el proceso de aclimatización tales como: sirve de sostén a la planta, permite un mejor intercambio de aire, facilita la absorción de agua por

las raíces, favorece la nutrición y por lo tanto el crecimiento de la planta. Por otro lado, las características físicas y químicas del sustrato permiten un crecimiento rápido y vigoroso de las plantas *in vitro* en esta fase, ya que posee los nutrientes esenciales para la planta como son nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio (Anexo 1), lo que favorece el posterior trasplante a condiciones de campo y obtener altos rendimientos.

En el caso de la zeolita esta favorece la aireación, absorción de nutrientes por la planta y un mejor suministro de agua y por otra parte, las propiedades de los materiales orgánicos empleados conducen a obtener una planta de excelente calidad fisiológica en la fase de aclimatización (Agramonte y col., 1998; Agramonte, 2000; Jiménez y col., 2001; Urbina y col., 2006). Sin embargo, Salazar y col., (2005) señalaron que no solo el tipo de sustrato beneficia la aclimatización de las plantas *in Vitro*, sino también su procedencia favorece la aclimatización en condiciones de casa de cultivo, lo cual coincide con el comportamiento observado en este experimento.

Por otro lado, autores como Debergh (1991) y Desjardins (1995) establecieron que el principal estrés que obstaculiza la aclimatización de las plantas procedentes del cultivo *in vitro* es la desecación o deshidratación y la señalaron como inhibidora de la formación de cera epicuticular de las hojas. Además, lo relacionaron con el pobre funcionamiento de los estomas, poco desarrollo de las células oclusivas, hojas más pequeñas y finas, pobre desarrollo del parénquima y de la cutícula con una considerable cantidad de espacios de aire en el mesófilo.

Resultados similares a los observados en este experimento en la variable supervivencia indicaron Pattnaik y Chand (2000) al mencionar valores de 87-95% en plantas *in vitro* de *Morus alba* L., *M. australis* Poir., *M. bombycis* Koidz., *M. cathyana* Hemls., *M. latifolia* Poilet y *M. nigra* L., provenientes de medio de cultivo semisólido y aclimatizadas en casa de cultivo sobre un sustrato compuesto por suelo y vermiculita (1:1). Lu (2002) refirió un valor de 95% de supervivencia en *Morus latifolia* Poilet empleando perlita y vermiculita (1:2) como sustrato.

Sin embargo, Sahoo *y col.*, (1997) y Bhau y Waklhu, (2001) señalaron valores inferiores de supervivencia (70-75%), a los observados en este experimento, aún cuando proporcionaron una preaclimatización de dos semanas en bolsas de plástico, con un sustrato compuesto por suelo y arena (1:1) bajo condiciones controladas de humedad y temperatura, además de que utilizaron otras variedades como la S-13 de *Morus indica* L. y Chinese White, Kukuso-27 e Ichinose de *Morus alba* L.

Además, los bajos índices referidos por estos autores pudieron estar relacionados con el tipo de sustrato y la longitud de los brotes empleados, la cual fue menor de 4,0 cm y en este experimento fue de 8,0. Al respecto, Palhares *y col.*, (2004) señalaron que la calidad del material vegetal *in vitro* tuvo gran responsabilidad en el porcentaje de supervivencia *ex vitro* e indicaron que aunque no es la longitud de los brotes la variable que manifestó el mayor efecto, sí influyó sobre ésta.

Varios autores han referido la importancia de un adecuado tamaño y buena calidad de las plantas *in vitro* para su adecuado desarrollo durante la fase de aclimatización, porque de ellas depende la supervivencia, velocidad de crecimiento y producción final en la fase de campo (Singha *y col.*, 1995; Dottin, 2000; Díaz *y col.*, 2004; Gnanam, 2004). Por su parte, García *y col.*, (2004) y Martínez *y col.* (2005b) señalaron que la aclimatización de las plantas *in vitro* depende fundamentalmente de las características fisiológicas, estructurales y anatómicas que las plantas presentan debido al desarrollo *in vitro*.

Este aspecto se hace particularmente importante en las especies leñosas, ya que esta fase es considerada como etapa más crítica en el proceso de propagación *in vitro* de estas especies. Teniendo en cuenta estas referencias es que se seleccionaron las plantas *in vitro* con una longitud promedio de 8,0 cm en la fase de multiplicación, tanto de medios de cultivo semisólidos como inmersión temporal, para la evaluación en condiciones *ex vitro*.

La importancia de la fase de aclimatización y el conjunto de los cambios que ocurren en la transición de las plantas condiciones *in vitro* a *ex vitro*, han sido bien definidas por varios autores (Pospisilova *y col.*, 1999; Hazarika, 2003; Hazarika, 2006; Martínez *y col.*, 2005b).

Las plantas *in vitro* bajo estas condiciones comienzan un proceso que puede durar varias semanas. Durante este tiempo se someten a una adaptación gradual a las condiciones de humedad y temperatura externas, en las cuales los órganos que se desarrollan muestran una transición de sus características anatómico-fisiológicas. Dentro de éstas se encuentran el desarrollo de la cutícula, las ceras epicuticulares y un eficiente funcionamiento estomático, regulando con esto el nivel celular del agua. Además, se inicia la actividad fotosintética y el desarrollo autotrófico de las plantas hasta lograr una total aclimatización.

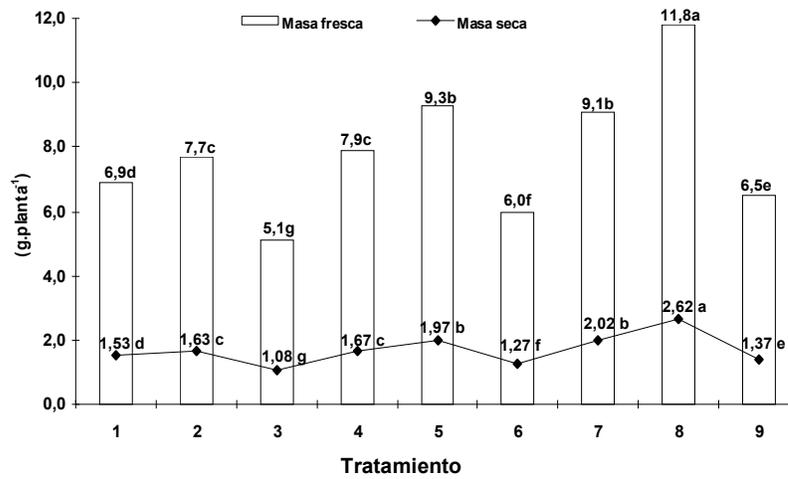
En *Eucalyptus grandis* Hill ex Maden (Delgado, 2000; Agramonte y col., 2001) e *Hibiscus elatus* Sw. (Trocones, 2000), observaron los mejores resultados al emplear un sustrato compuesto por 85% de humus de lombriz y 15% de zeolita, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este experimento. Por su parte Maciel y col., (2002) en plantas de *Malus prunifolia* provenientes de medio de cultivo semisólido, obtuvieron los mejores resultados en cuanto a número de hojas (11,0) y altura de la planta (4,3 cm) a los 60 días de aclimatización con el empleo de humus de lombriz y suelo en una relación 1:1 de cada uno de ellos. Mientras que Silva y col., (2005) mencionaron que los valores más altos en las mismas variables, los observaron al usar como sustrato suelo y arena (1:1) en plantas *in vitro* de *Eucalyptus urograndis* obtenidas en medio de cultivo semisólido, a los 30 días en fase de aclimatización.

En plantas de *Morus alba* L. variedad Criolla obtenidas por el método convencional de propagación (estacas), Noda y col., (2003) observaron una mayor longitud de las ramas (27,2 cm) a los 49 días de plantadas en canteros con cachaza y suelo con respecto a la observada en este experimento. Esto puede deberse a que los autores realizaron una aplicación previa a las estacas con AIB y ANA para favorecer su enraizamiento. Sin embargo, el número de hojas (2,5) fue inferior.

En otras especies vegetales no leñosas obtenidas por cultivo *in vitro* como *Saccharum* spp., Díaz y col., (2004) no observaron diferencias significativas con el empleo de humus

de lombriz combinado con suelo a diferentes porcentajes de cada uno a los 60 días de aclimatización para la variable longitud de la planta.

La mayor cantidad de masa fresca y seca obtenida en las plantas procedentes de inmersión temporal (Figura 11), estuvo relacionada principalmente con una mayor longitud de la planta y número de hojas con diferencias significativas en relación con las plantas procedentes de medio de cultivo semisólido y estacas (Tabla 8).



a, b: Medias con letra distinta en cada variable difiere para $p < 0,05$ de acuerdo con Tukey
 MG \pm EE: Masa fresca: $7,8 \pm 0,09$. Masa seca: $1,7 \pm 0,03$

- Tratamiento: 1. Plantas procedentes de medio de cultivo semisólido en humus de lombriz al 100%
 2. Plantas procedentes de sistemas de inmersión temporal en humus de lombriz al 100%
 3. Plantas procedentes de estacas en humus de lombriz al 100%
 4. Plantas procedentes de medio de cultivo semisólido en humus de lombriz 50% y zeolita 50%
 5. Plantas procedentes de sistemas de inmersión temporal en humus de lombriz 50% y zeolita 50%
 6. Plantas procedentes de estacas en humus de lombriz 50% y zeolita 50%
 7. Medio de cultivo semisólido en humus de lombriz 85% y zeolita 15%
 8. Sistemas de inmersión temporal en humus de lombriz 85% y zeolita 15%
 9. Estacas en humus de lombriz 85% y zeolita 15%

Figura 11. Influencia del tipo de sustrato en la masa fresca y seca de las plantas *in vitro* de *Morus alba* L. variedad Criolla en fase de aclimatización.

En algunas especies leñosas como *Sinningia speciosa* Lood. Hiern. y *Eucalyptus urograndis*, Bortolotti y col., (2003) y Silva y col., (2005) indicaron los mejores resultados en las variables masa fresca y seca en plantas obtenidas en medio de cultivo semisólido al utilizar vermiculita y plantmax (1:1) y suelo y arena (1:1), respectivamente. Además, señalaron el contenido de masa seca y longitud de las plantas como principales variables

de calidad de las plantas en fase de aclimatización debido a la composición de la pared celular y del protoplasma, como lo establecieron también Castro y González (2002).

La respuesta favorable de las plantas *in vitro* a la transferencia directa desde el medio de cultivo de multiplicación hacia el ambiente *ex Vitro*, demostró la factibilidad de la adaptación *ex vitro* en esta especie sin la necesidad de una preparación *in vitro* o una fase de enraizamiento. El éxito de esta forma de aclimatización estuvo dado por las condiciones bajo las cuales se mantuvieron las plantas. En primer lugar, un sustrato con buenas propiedades de aireación, drenaje y contenido nutritivo como la mezcla humus de lombriz con zeolita; humedad adecuada garantizada por la frecuencia y tipo de riego así como por los cobertores de la casa de cultivo e iluminación moderada a través de las mallas de sombreo utilizadas principalmente en las primeras dos semanas de aclimatización.

Con estos resultados se demuestra que con la combinación de 15% de zeolita con 85% de humus de lombriz como sustrato en la fase de aclimatización, se logran plantas de *Morus alba* L. variedad Criolla de alta calidad en términos de una mayor producción de masa seca y altura de la planta como material de plantación para la fase de campo.

4.4. Caracterización morfológica en condiciones de campo de las plantas obtenidas por cultivo *in vitro*

La evaluación de las plantas obtenidas a través del cultivo *in vitro* en condiciones de campo, permitió conocer su crecimiento y desarrollo bajo estas condiciones y compararlas cuantitativa y cualitativamente respecto a las obtenidas por estacas. De acuerdo con los resultados de este estudio en las variables cuantitativas, el método de propagación de las plantas influyó significativamente sobre la longitud de la planta, número de hojas, número de ramas, área foliar y producción de biomasa foliar en condiciones de campo. El análisis de estas variables indicó que en todos los casos las plantas procedentes de los SIT y medios de cultivo semisólidos superaron en todas las evaluaciones a las obtenidas mediante estacas. No se observaron diferencias significativas entre las plantas procedentes de medio de cultivo semisólido y las de SIT. Estos resultados evidenciaron

las ventajas que tiene la propagación *in vitro* en relación con la convencional expresadas principalmente en un mayor crecimiento y producción de biomasa (Tabla 9).

Tabla 9. Variables cuantitativas evaluadas en las plantas de *Morus alba* L. variedad Criolla obtenidas por cultivo *in vitro* en condiciones de campo a los 4, 8 y 12 meses de cultivo

	Altura de la planta (cm)	Número de hojas	Número de ramas	Área foliar (cm ²)	Biomasa foliar (g.planta ⁻¹)
Evaluación a los 4 meses					
SS	95,1 a	227,6 a	9,6 a	152,63 a	56,7 a
SIT	98,0 a	237,1 a	10,2 a	170,20 a	60,2 a
E	68,3 b	121,2 b	3,8 b	113,67 b	25,1 b
±EE	1,15	4,5	0,26	6,01	1,33
Evaluación a los 8 meses					
SS	154,4 a	422,0 a	18,5 a	249,69 a	129,7 a
SIT	159,0 a	445,0 a	19,6 a	268,19 a	135,4 a
E	115,3 b	194,0 b	6,7 b	201,43 b	71,7 b
±EE	1,66	10,0	0,51	7,1	2,14
Evaluación a los 12 meses					
SS	238,1 a	541,3 a	20,9 a	355,43 a	284,4 a
SIT	242,3 a	579,6 a	22,1 a	382,80 a	291,4 a
E	198,3 b	238,8 b	6,7 b	289,72 b	119,2 b
±EE	1,73	13,6	0,61	9,19	3,04

a, b. Medias con letras distintas en la misma columna difieren para $p < 0,05$ de acuerdo con Tukey
 SS: Medio de cultivo semisólido. SIT: Sistemas de inmersión temporal. E: Estacas. EE: Error estándar.

El mayor crecimiento y desarrollo en campo de las plantas obtenidas por cultivo *in vitro* puede ser debido al efecto de rejuvenecimiento y saneamiento provocado por el cultivo *in vitro*, lo cual es muy frecuente en especies leñosas (Gómez y col., 2002; Salvi y col., 2002; Olmos y col., 2004). Este rejuvenecimiento *in vitro* se produce al perder el tejido la señal que poseía de la planta madre manifestándose como un aumento en el vigor fisiológico de determinadas variables agronómicas (Pérez, 1998).

Debido a que en la bibliografía consultada no se encontraron estudios referentes a la evaluación de plantas *in vitro* de morera en condiciones de campo, la discusión se hizo al considerar otras especies leñosas y los experimentos realizados por otros autores con el empleo del método convencional de propagación en esta especie.

Los valores obtenidos para la variable supervivencia fueron de 97,5; 98,5 y 97,0% para las plantas obtenidas en medio de cultivo SS, SIT y E, respectivamente; lo cual indicó que en las condiciones de cultivo donde se desarrollaron las plantas evaluadas y con el proceso de aclimatización (acápite 4.3) se lograron plantas morfológicamente aptas para su establecimiento en condiciones de campo. No obstante, en la supervivencia de las plantas procedentes del cultivo *in vitro* en condiciones ambientales, influyen varios factores. Entre los más importantes se encuentran el desarrollo y crecimiento alcanzado en la casa de cultivo, el manejo de las plantas al momento de la plantación, labores culturales postplantación (riego, fertilización), etc.

Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Sanginés y col., (1999), Toral y col., (1999) y Benavides, (2002), quienes mencionaron valores de 98 a 100% de supervivencia en estacas de morera sembradas en campo. Sin embargo, Domínguez y col., (2001) indicaron un valor inferior (60,2%) que atribuyeron a las condiciones edafoclimáticas que prevalecieron durante el desarrollo del experimento.

En la literatura científica consultada son pocos los estudios sobre el crecimiento y desarrollo en campo de plantas *in vitro* de especies leñosas y sobre todo que muestren resultados comparativos donde se relacionen tanto plantas obtenidas por cultivo de tejidos como plantas obtenidas por el método convencional de propagación. Específicamente en el caso de morera no se encontraron trabajos que refieran estas comparaciones.

A nivel mundial los estudios realizados en morera han sido con el propósito de hacer más eficiente el proceso de propagación convencional (por estacas) y la producción de biomasa foliar debido al alto valor nutricional del follaje y la capacidad de producir altos volúmenes de biomasa.

Otros autores en diferentes especies de plantas obtenidas por cultivo *in vitro* también refieren su superioridad con respecto a las propagadas convencionalmente cuando las compararon en condiciones de campo. Por ejemplo, en plantas *in vitro* de un híbrido de álamo (*Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.), Luoranen y col., (2006) obtuvieron un 97% de supervivencia en condiciones de campo e indicaron un mejor

desarrollo en cuanto a altura de la planta, diámetro del tallo y número de ramas, respecto a las plantas obtenidas de estacas durante dos años de evaluación. Resultados similares (95% de supervivencia) en plantas cultivadas *in vitro* de cacao (*Theobroma cacao* L.) fueron observados por Maximova y col., (2008), quienes indicaron mayor superioridad de éstas plantas en cuanto a la altura de la planta, diámetro del tallo, tiempo de fructificación y tamaño del fruto respecto a las de estacas, debida principalmente a un mayor vigor fisiológico y saneamiento de la plantas provocados por el cultivo *in vitro*.

Los resultados de la presente investigación coinciden con los informados por varios autores al evaluar en condiciones de campo plantas cultivadas *in vitro* de otras especies leñosas quienes señalaron un crecimiento más vigoroso expresado en una mayor longitud de las plantas, mayor número de hojas por planta y mayor producción de biomasa en estas plantas respecto a las obtenidas mediante la propagación convencional (Zebrowska y col., 2003; Litwinczuk, 2004; Agostini y Echeverringaray, 2006; Maximova y col., 2008). Esto indica una mayor velocidad de crecimiento de las plantas y producción de estacas o material vegetal para propagación y mayor producción de biomasa.

En este sentido, las ventajas de la propagación *in vitro* de la morera se evidenciaron al comparar los valores obtenidos en las plantas procedentes de inmersión temporal y de estacas en la evaluación realizada a los 12 meses. Se comprobó un incremento de 44,0 cm en la altura de las plantas, 340.8 hojas, 15,4 ramas, 93,08 cm² de área foliar y 72,2 g de biomasa foliar en las plantas obtenidas en SIT con respecto a las de estacas. Estos resultados los corroboraron Olmos y col., (2004), Briccoli Bati y col., (2006) y Leva, (2009), quienes establecieron un mejor comportamiento de las plantas obtenidas por cultivo de tejidos expresado en condiciones *ex vitro* debido al mayor metabolismo autotrófico que manifestaron estas plantas.

En el presente estudio, las diferencias entre las plantas *in vitro* y las obtenidas mediante estacas fueron claramente visibles e indicaron que las condiciones de cultivo *in vitro* influyeron marcadamente en el fenotipo de las plantas, este es un hecho muy común en

muchas especies de plantas leñosas, tal como lo indicaron Litwinczuk y col., (2005), Biswas y col., (2008) y Arya y col., (2009) en otras especies.

Al comparar los resultados de este trabajo en las plantas propagadas por estacas en relación con otros autores tales como Toral y col., (1999) quienes evaluaron en condiciones de campo plantas de *Morus alba* L. variedad Criolla, refieren datos de longitud de las plantas (2,3 m) similares a los obtenidos en este trabajo para la misma variedad. Por su parte, Almeida y Canto (2002) señalaron un promedio de 26,3 hojas en 30 variedades de *Morus alba* L. cuando estas alcanzaron de 100 a 150 cm de longitud. Estos resultados fueron inferiores a los obtenidos en este estudio, ya que en la evaluación realizada a los cuatro meses las plantas tenían 121,2 hojas y aún no habían alcanzado esa longitud.

En relación con el número de ramas por planta, los mejores resultados se observaron en las plantas procedentes del cultivo *in vitro* con valores de 20,9 y 22,1 para las cultivadas en medio de cultivo semisólido e inmersión temporal, respectivamente, los cuales fueron tres veces superiores a los obtenidos en las plantas procedentes de estacas (6,7). Al mismo tiempo, pueden ser utilizadas como material de plantación. Sin embargo, otros autores como Martín y col., (2000), Domínguez y col., (2001) y Benavides, (2002) señalaron valores inferiores en relación a los encontrados en este estudio en las plantas procedentes de estacas. Este resultado puede ser debido a que estas plantas iniciaron su crecimiento bajo condiciones controladas de casa de cultivo previo a su trasplante en campo, lo que garantizó un desarrollo más sano y vigoroso en esta fase y por consiguiente un crecimiento más rápido en el campo.

Se observó un incremento en el área foliar conforme al tiempo de evaluación y se obtuvo el valor más alto a los 12 meses en las plantas procedentes de inmersión temporal y medio de cultivo semisólido con diferencias significativas respecto a las propagadas por estacas. El área foliar es una variable fundamental en la evaluación en campo de morera debido a que está relacionada directamente con la producción de biomasa foliar y depende del número de hojas y ramas (Machii y col., 2000; Sohn, 2003).

Los resultados de esta variable en las plantas obtenidas por estacas a los 12 meses de evaluación coinciden con los indicados por Yongkang, (2002), quien informó un promedio de 245,92 cm² de área foliar en 10 variedades de *Morus alba* L. y por Yungen (2003) con un valor de 238,19 cm² en la variedad Honh Ding Sang de *Morus multicaulis* Perr. Además, establecieron que en las diferentes variedades de morera existía una relación muy estrecha entre el área foliar y el número de hojas y ramas lo cual coincide con los autores anteriormente mencionados y los resultados de este experimento.

Los valores obtenidos para la variable biomasa foliar fueron inferiores a los indicados por Martín y col., (2002) en plantas de *Morus alba* L. variedad Tigreada, quienes mencionaron una producción de biomasa de 645 g.planta⁻¹.año⁻¹, esto se debe a que los autores incluyeron en esta variable el pecíolo, la hoja y tallos tiernos, y en éste experimento sólo se usaron las hojas. Al respecto, Benavides (2002), Sánchez (2002b) y Ye (2002) mencionaron que la producción de biomasa foliar en morera estuvo influenciada por varios factores como el número de hojas, variedad, localidad, edad de la planta, tipo de suelo, método de propagación y densidad de siembra. Estos autores señalaron que cuando el objetivo es la producción de biomasa se pueden plantar desde 20 hasta 50 mil plantas por hectárea. Sin embargo, Ye, (2002) y Noda y Martín, (2008) recomendaron la densidad de 25 mil para obtener plantas de mayor calidad tomando en cuenta la competencia que ejercen las plantas por el espacio, la luz y los nutrientes.

Para las variables cuantitativas no hubo diferencias significativas entre las plantas procedentes del cultivo *in vitro*, por lo tanto las diferencias con respecto a las plantas obtenidas por estacas, estuvieron determinadas por aspectos fisiológicos relacionados con el rejuvenecimiento del material vegetal. Las plantas *in vitro* tienen un mayor potencial de producción de biomasa ya que son fisiológicamente más jóvenes por lo que tienen un comportamiento en campo superior respecto a las obtenidas de estacas.

Estos resultados, observados sobre todo, en las plantas procedentes del cultivo *in vitro* en *Morus alba* L. variedad Criolla, son importantes para conocer la dinámica de crecimiento y desarrollo de las mismas, ya que se tiene muy poca experiencia en este tipo de

plantación. Además, propician el establecer algunas estrategias que permitan una mayor efectividad en su explotación en condiciones de producción.

De acuerdo con el método convencional de propagación, el primer corte o cosecha de *Morus alba* L. debe efectuarse a los 12 meses después de establecida la plantación (Ye, 2002; Pescio y col., 2006; Harizanis, 2007). En ese momento se logra una longitud promedio de 200 cm, la cual es un indicador del estado de madurez de la plantación, por lo que se encuentra en condiciones de iniciar la cosecha (Toral y col., 1999). Sin embargo, como se aprecia en los resultados de este trabajo las plantas provenientes del cultivo *in vitro*, alcanzaron esta longitud antes que las de estacas con una producción de biomasa foliar significativamente superior.

Por lo tanto estos resultados demuestran la ventaja que representa este tipo de material de plantación, pues se adelanta la cosecha, se obtiene una mayor cantidad de material vegetal para plantación o propagación y también se pueden lograr mayores volúmenes de biomasa foliar.

Por otro lado, los caracteres cualitativos evaluados en este experimento no mostraron diferencias en las variables analizadas y coincidieron con las características de las plantas de *Morus alba* L. variedad Criolla definidas en el Descriptor de la variedad estas fueron: forma de la hoja ovada, el color fue verde oscuro, con la superficie lisa, textura membranosa y el margen ondulado. Además, se observó una mayor uniformidad de las plantas *in vitro* respecto a las procedentes de estacas.

De acuerdo con Machii y col., (2000) y Sohn (2003) los caracteres cualitativos evaluados en las diferentes especies del género *Morus* se basan principalmente en las características de las hojas, las cuales determinan las diferencias entre ellas. Por otro lado, las hojas son el principal objeto de estudio en las diferentes investigaciones realizadas a nivel mundial, debido a que es el principal alimento del gusano de seda (*Bombix mori* L.) y para el cual están enfocados los estudios llevados a cabo en la evaluación de diversos métodos de propagación, mejoramiento genético, aspectos agronómicos y de rendimiento, descripción y caracterización varietal, entre otros, al

emplear tanto las técnicas convencionales de cultivo como las biotecnológicas (Lu 2002; Vijayan y Padmaja, 2002; Anis y col., 2003; Habib y col., 2003; Hassanein y col., 2003; Koyuncu, 2004; Umate y col., 2005).

El vigor, tamaño y producción de biomasa de las plantas procedentes del cultivo de tejidos fueron superiores en relación con las obtenidas de estacas observados a través de la longitud de las plantas, número de hojas, número de ramas, área foliar y producción de biomasa foliar; en esto influyó la mayor calidad intrínseca que poseían las plantas desde el cultivo *in vitro*.

4.5 Estudio molecular de la estabilidad genética de las plantas *in vitro* de morera

Con las combinaciones de cebadores ISTR empleadas, se revelaron un total de 553 productos amplificados, de los cuales 537 (97,11%) no mostraron polimorfismo entre las muestras de las plantas procedentes de medio de cultivo semisólido, sistemas de inmersión temporal y estacas de *Morus alba* L. variedad Criolla. Por otro lado, solo 10 de las combinaciones evaluadas fueron informativas ya que en las otras seis no se determinaron bandas polimórficas (Tabla 10).

En términos generales las combinaciones de cebadores informativas coincidieron con una o tres bandas polimórficas por lo que los niveles de polimorfismo asociados a cada combinación variaron en un rango entre 0 y 6,97%, lo cual es un indicador de la alta homogeneidad genética entre las plantas obtenidas por cultivo *in vitro* y las de estacas. La combinación F8/B6 permitió identificar el mayor número de bandas (46 fragmentos), mientras que las parejas de cebadores F3/B8 y F10/B6 identificaron el menor número de bandas (30 fragmentos).

La heterocigosidad promedio esperada fue baja ($He = 0,0265$) la cual corrobora los valores obtenidos del porcentaje de polimorfismo y la estabilidad genética del material vegetal evaluado. La mayor He se obtuvo con la combinación de cebadores F3/B5 ($He = 0,0674$), mientras que en las combinaciones F3/B7, F5/B5, F5/B6, F5/B7, F10/B7 y F10/B8 se obtuvo el menor valor ($He = 0,000$).

Tabla 10. Número de bandas detectadas en plantas de *Morus alba* L. variedad Criolla procedentes del cultivo *in vitro* y de estacas con el empleo de marcadores moleculares ISTR.

Cebadores	BA*	BP*	P (%)*	(Ho)*	(He)*
F3/B5	43	3	6,97	0,0698	0,0674
F3/B6	36	2	5,55	0,0556	0,0541
F3/B7	35	0	0,00	0,0000	0,0000
F3/B8	30	1	3,33	0,0333	0,0328
F5/B5	31	0	0,00	0,0000	0,0000
F5/B6	34	0	0,00	0,0000	0,0000
F5/B7	33	0	0,00	0,0000	0,0000
F5/B8	34	1	2,94	0,0294	0,0290
F8/B5	31	1	3,22	0,0323	0,0317
F8/B6	46	3	6,52	0,0652	0,0631
F8/B7	35	2	5,71	0,0571	0,0556
F8/B8	34	1	2,94	0,0294	0,0290
F10/B5	35	1	2,85	0,0286	0,0282
F10/B6	30	1	3,33	0,0333	0,0333
F10/B7	34	0	0,00	0,0000	0,0000
F10/B8	32	0	0,00	0,0000	0,0000
Total	553	16	2,89	0,0271**	0,0265**

* BA: Bandas analizadas. BP: Bandas polimórficas. P: Polimorfismo.

Ho: Heterocigosidad observada. He: Heterocigosidad esperada.

** Promedio.

Las parejas de oligonucleótidos F3/B5 y F8/B6 revelaron los mayores porcentajes de polimorfismo (6,97% y 6,52%, respectivamente) con tres fragmentos de amplificación en cada una de ellas, además la calidad de los productos obtenidos fue mejor y el patrón de los fragmentos de amplificación fue más consistente (Figura 12).

Por lo general, el cultivo *in vitro* de plantas genera variabilidad genética en dependencia del método de regeneración (Polanco y Ruíz, 2002; González y *col.*, 2003; Sánchez y *col.*, 2003; Infante y *col.*, 2006), sin embargo en este experimento no se observaron diferencias genéticas entre las plantas procedentes del cultivo *in vitro* y las obtenidas por estacas con las combinaciones de cebadores ISTR empleadas. Esto se puede deber a que el método

de regeneración empleado en este estudio fue mediante organogénesis directa, el cual se conoce como el método de regeneración que menos probabilidad de variación presenta debido principalmente a que se origina de tejido más diferenciado y garantiza a un mejor nivel la conservación de las características del explante o de la planta madre mediante la estimulación de órganos completos de la planta (Pérez, 1998; Kawiak y Lojkowska, 2004; Bennici y col., 2004; Torres y col., 2005; Panda y col., 2007).

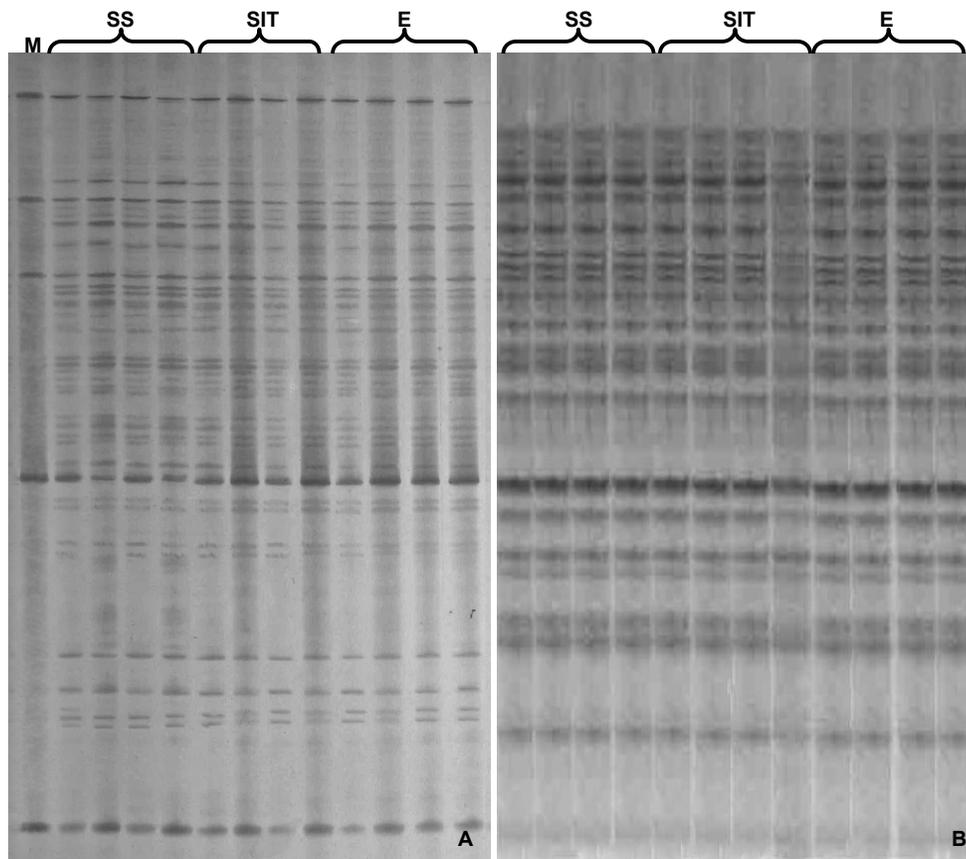


Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida 4% de los productos ISTR generados con la combinación de cebadores A). F8/B6 y B). F3/B5 en plantas de morera. Marcador de peso molecular (M: 50 bp ladder O'RangeRuler™, MBI Fermentas), plantas cultivadas en medio de cultivo semisólido (SS), plantas cultivadas en sistemas de inmersión temporal (SIT) y estacas (E).

Por otro lado, en la evaluación de la estabilidad genética de plantas propagadas *in vitro* de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con el uso de marcadores RAPD, Soniya y col., (2001) observaron un coeficiente de similaridad promedio de 96% entre las plantas madre y su progenie *in vitro* a pesar de que las plantas se obtuvieron vía organogénesis indirecta. De

la misma forma, Gómez y col., (2002) no observaron variabilidad genética en plantas *in vitro* de banano obtenidas mediante embriogénesis somática.

En este sentido, algunos autores como Zucchi y col., (2002) y Modgil y col., (2005), indicaron que la causa exacta de la variación somaclonal en el cultivo de tejidos es aún desconocida, sin embargo, señalaron que, las alteraciones en la relación auxina/citoquinina y su concentración, origen del explante, genotipo, composición del medio de cultivo, duración del cultivo *in vitro*, número de subcultivos, el estrés *in vitro* y las alteraciones en el ritmo diurno y condiciones nutricionales, juntas o separadas son causas de variabilidad genética en las plantas.

A partir de los análisis de datos de similitudes para las tres procedencias de plantas, se observó una relación de similitud alta y no significativa entre las plantas obtenidas por cultivo *in vitro* respecto a las de estacas con coeficientes que fueron de 0,974 a 1,0, lo cual demuestra el grado de homogeneidad genética entre las plantas evaluadas y que la variación producida durante el proceso de propagación *in vitro* fue mínima.

Kanwar y col., (2005) al evaluar la estabilidad genética de plantas *in vitro* de morera con el empleo de siete isoenzimas como marcadores, observaron coeficientes de 0,85 a 1,00 e indicaron que el nivel de monomorfismo encontrado fue debido a que las plantas fueron obtenidas mediante yemas axilares las cuales producen muy poca o nula variación genética. Por su parte, Sharma y col., (2000), Awasthi y col., (2004), Vijayan y col., (2006) y Orhan y col., (2007) no observaron variabilidad intergenotipo con el uso de marcadores AFLP, RAPD e ISSR, sin embargo obtuvieron una marcada variación genética intragenotipos en el género *Morus*, estos resultados los utilizaron para identificar la diversidad genética que existe en la especie.

En otras especies como *Persea americana* Mill., *Agave tequilaza* Weber y *Agave cocui* Trel, Ramírez y col., (2002), Torres y col., (2006) y Rodríguez y col., (2007) indicaron resultados similares en estas especies vegetales con el empleo de marcadores ISTR y determinaron la efectividad de este tipo de marcadores en la identificación de genotipos y

diversidad genética tanto en plantas derivadas del cultivo *in vitro* como del cultivo tradicional.

De igual manera, con el empleo de marcadores ISSR y RAPD para evaluar la variabilidad genética de plantas *in vitro* de *Solanum Lycopersocum* L. (Soniya y col., 2001), *Oryza sativa* L. (Medina y col., 2000; Medina y col., 2004), *Vaccinium* sp. (Martínez y col., 2007), *Stylosanthes capitata* Vog. (De Lima y col., 2006), *Malus pumila* Mill. (Modgil y col., 2005), *Musa* sp. (Gómez y col., 2002; Lakshmanan y col. 2007; Venkatachalam y col., 2007), *Foeniculum vulgare* Mill. (Bennici y col., 2004), *Curcuma Longa* L. (Panda y col., 2007) y *Saccharum officinarum* L. (Zucchi y col., 2002), no se observaron diferencias genéticas entre las plantas madre y las obtenidas por cultivo *in vitro*, lo que garantizó la estabilidad genética de las plantas regeneradas y la conservación de las características de las plantas donadoras.

De acuerdo con la literatura científica consultada se han realizado diferentes estudios en morera con el empleo de diferentes marcadores moleculares como SSR (Bhattachyaria y col., 2005), ISSR (Tani y col., 2006; Zhao y col., 2007a,b; Kar y col., 2008), RAPD (Vijayan y col., 2004a,b; Burgess y col., 2005; Orhan y col., 2007), AFLP (Sharma y col., 2000) y DAMD (Bhattachyaria y Ranade, 2001; Bhattachyaria y col., 2005), sin embargo no se encontró ningún trabajo donde se utilizaran los marcadores ISTR para algún análisis de carácter genético.

En este sentido, Zhouqi y col., (2004), Infante y col., (2006), Zhao y col., (2006), Zhao y col., (2007a), indicaron que en la determinación de la estabilidad y variabilidad genética de plantas obtenidas por cultivo *in vitro*, sólo en algunos estudios se ha encontrado variabilidad genética y ésta, ha sido morfológicamente indistinguible. Además, se obtiene una mejor estimación de la variabilidad genética presente en las plantas obtenidas con este método de propagación e información esencial para la conservación y uso del germoplasma (Infante y col. 2002; González y col., 2003; Infante y col., 2006).

Al respecto, Zhao y col., (2007b) en un estudio preliminar con siete variedades de morera no observaron variabilidad genética con el empleo de marcadores genéticos ISSR e

indicaron que las plantas obtenidas mediante el cultivo de tejidos se pueden emplear en programas de selección y mejoramiento genético.

En los análisis genéticos realizados en morera propagada por el método tradicional, Awasthi y col., (2004); Zhao y col., (2005b); Zhao y col., (2007b) observaron variabilidad genética intrapoblacional pero no interpoblacional e indicaron que estos resultados se pueden utilizar en los programas para la conservación de germoplasma. Por otro lado, con el uso de marcadores ISSR, RAPD y AFLP obtuvieron información suficiente para estimar variabilidad genética así como para determinar las relaciones genéticas entre diferentes especies del género *Morus*.

El presente estudio reveló que el análisis basado en la técnica ISTR es informativa para estimar el grado de similitud y para estimar las relaciones genéticas en plantas de morera procedentes de diferentes métodos de propagación, con niveles de monomorfismo suficientes para establecer un grupo de datos informativos con las combinaciones de cebadores empleadas en este estudio. Por otro lado, los resultados de este experimento pueden servir para uso práctico en el mapeo del genoma de la morera y su mejoramiento; además proveen una base informativa para establecer la estabilidad genética de las plantas obtenidas mediante el cultivo *in vitro* (organogénesis directa) respecto a las procedentes de estacas.

Las plantas procedentes de SS, SIT y E evaluadas mediante ISTR, resultaron genéticamente idénticas, esto confirmó la aplicabilidad de los cebadores ISTR para el estudio de la estabilidad genética del material vegetal propagado por cultivo *in vitro*, así como de los resultados alcanzados en este estudio con la caracterización morfológica (acápite 4.4). Además, garantiza la posibilidad de utilizar las plantas propagadas mediante cultivo de tejidos en un esquema de producción de semillas de alta calidad para este cultivo.

Teniendo en cuenta los resultados de este trabajo se propone el siguiente protocolo para la propagación *in vitro* de morera (*Morus alba* L.) variedad Criolla (Figura 13):

1. Selección en campo de plantas élite vigorosas y sanas.

2. Colectar yemas apicales de rebrotes con cuatro meses después del corte, lavar en agua con detergente en un agitador orbital a 100 rpm durante cinco minutos.
3. Enjuagar varias veces con agua para eliminar los residuos del detergente.
4. Desinfectar con etanol al 70% por un minuto seguido con una solución de hipoclorito al 1,0 % durante 15 minutos.
5. Eliminar los tejidos dañados y colocar los explantes de aproximadamente 1,5 cm en tubos de ensayo en medio de cultivo (MSM + 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol + 1,0 mg.L⁻¹ de tiamina + 30 g.L⁻¹ de sacarosa + 0,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP) semisólido o líquido con soporte de papel filtro.
6. Emplear el material vegetal derivado de la fase de establecimiento para su multiplicación en medio de cultivo (MSM + 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol + 1,0 mg.L⁻¹ de tiamina + 30 g.L⁻¹ de sacarosa + 0,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de ANA) semisólido o líquido en los sistemas de inmersión temporal. Realizar cuatro subcultivos en medio de cultivo semisólido y dos en los SIT cada 28 días.
7. Plantar en la fase de aclimatización las plantas *in vitro* con 8,0 cm de longitud, sobre un sustrato compuesto por 85% de humus de lombriz y 15% de zeolita, en contenedores con alvéolos de aproximadamente 120 cm³ de capacidad. Disminuir la intensidad luminosa a 220 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ aproximadamente las primeras dos semanas, con una frecuencia de seis riegos por día y una duración de dos minutos cada uno durante las primeras dos semanas. Posteriormente estos se reducen a tres por día con la misma duración.
8. Después de 45 días en la fase de aclimatización y una altura promedio de 30 a 35 cm, llevarlas a campo con un marco de plantación de 1,0x0,5 m entre líneas y plantas respectivamente.

Por lo tanto, el proceso de propagación *in vitro* desde la disección de las yemas apicales hasta la aclimatización se realiza en un tiempo aproximado de cinco a seis meses y se obtienen plantas con una altura de 30 a 35 cm y con 10 a 13 hojas para trasplantar al campo o para su comercialización.

El proceso permite obtener un material vegetal sano, rejuvenecido y uniforme en un periodo de tiempo relativamente corto, contribuyendo a mejorar la calidad de las plantas en términos de un mayor tamaño y producción de biomasa. En el caso que se utilicen las plantas *in vitro* como bancos clonales, se obtienen elevados coeficientes de multiplicación y altas producciones de estacas por área.

Por lo tanto, al considerar las limitantes que tiene la propagación convencional entre las que se destacan la poca disponibilidad de material para plantación, propagación lenta, bajos índices de multiplicación y pobre desarrollo radicular, el protocolo establecido en este estudio ya sea con el empleo de medio de cultivo semisólido o líquido en los sistemas de inmersión temporal, constituye una alternativa de solución a dicha problemática debido a las ventajas que presenta la propagación *in vitro*, entre las cuales se encuentran altos coeficientes de multiplicación, uniformidad en las plantas producidas, elevadas producciones en espacios reducidos, plantas libres de enfermedades y producción durante todo el año.

Aunado a lo anterior, si se cuenta con sistemas semi-automatizados como son los sistemas de inmersión temporal se tiene mayor efectividad con los medios de cultivo líquido relacionados a una mayor difusión de los elementos minerales, los cuales son absorbidos con mayor facilidad por las plantas para almacenarlos y utilizarlos en la producción de brotes o biomasa. Las plantas tienen menor estrés al realizar los subcultivos, se facilita el manejo ya que sólo se necesita adicionar el medio de cultivo fresco dentro del frasco sin necesidad de eliminar el medio de cultivo residual y se disminuyen considerablemente los costos por la exclusión del gelificante lo que incrementa en más del 50% la productividad (Pérez y col., 1998; Agramonte, 2000).

Por otro lado, al realizar cuatro subcultivos en medio de cultivo semisólido se obtienen hasta 4 129 explantes por cada explante inicial. No obstante, este valor se incrementa al llevar a cabo dos subcultivos en medio de cultivo semisólido y dos en medio de cultivo líquido con el empleo de los sistemas de inmersión temporal a 10 946 explantes. Con lo anterior se hace más eficiente el proceso de propagación *in vitro* debido al aumento en el

coeficiente de multiplicación y se evita la aparición de variabilidad somaclonal, además el proceso de propagación desarrollado por organogénesis directa el cual es el método de regeneración que presenta la mayor estabilidad genética en el material producido (Koyuncu, 2004; Torres y *col.*, 2005; Panda y *col.*, 2007).

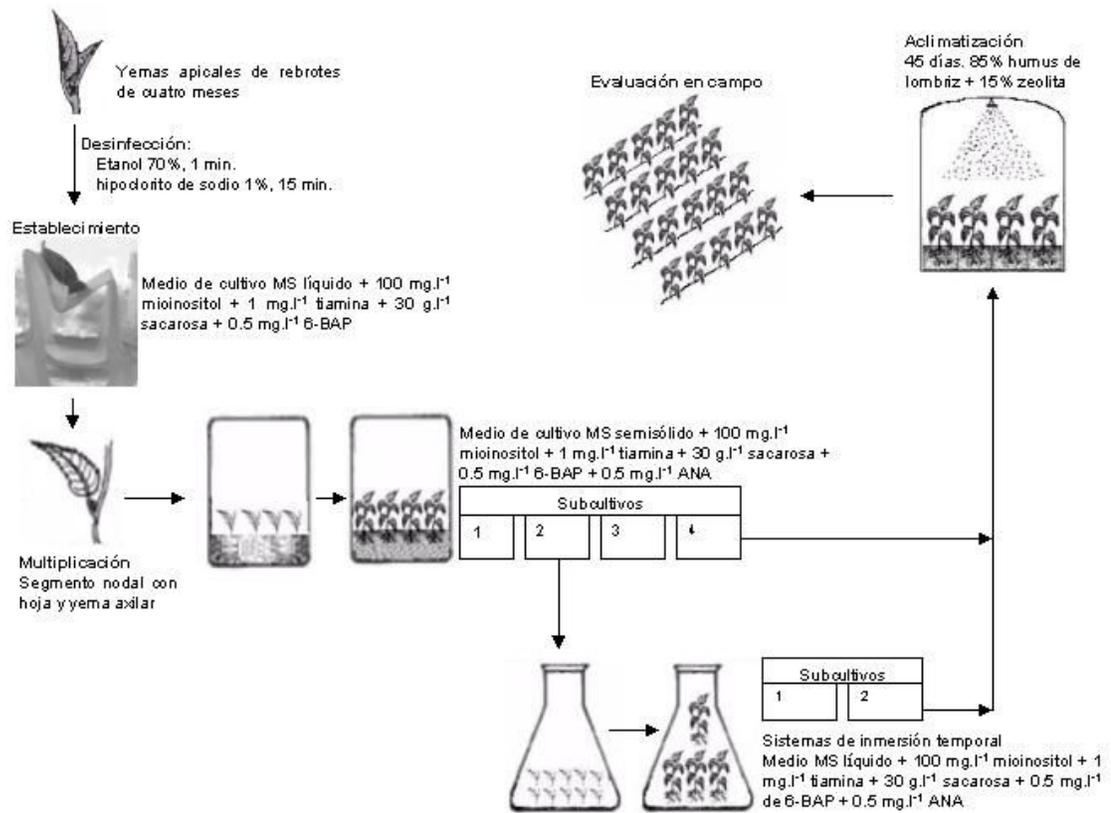


Figura 13. Protocolo propuesto para la propagación *in vitro* de *Morus alba* L. variedad Criolla.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados y los resultados del presente trabajo se concluye lo siguiente:

- ✦ Se logró el establecimiento *in vitro* de yemas apicales de *Morus alba* L. variedad Criolla a partir de plantas de campo, con el empleo de hipoclorito de sodio como desinfectante y 6-BAP como regulador de crecimiento.
- ✦ Fue posible la multiplicación *in vitro* de *Morus alba* L. variedad Criolla con el empleo de medios de cultivo semisólidos y Sistemas de Inmersión Temporal. Se comprobó que con los Sistemas de Inmersión Temporal se mejoró la calidad de las plantas y se incrementó el coeficiente de multiplicación.
- ✦ La caracterización morfológica de las plantas en condiciones *ex vitro*, las evaluaciones cuantitativas y cualitativas en campo, así como el uso de los marcadores ISTR, permitieron comprobar la estabilidad fenotípica y genética de las plantas *in vitro* de *Morus alba* L. variedad Criolla.
- ✦ A partir de los resultados de este trabajo se estableció un protocolo para la propagación *in vitro* de *Morus alba* L. variedad Criolla.

6. RECOMENDACIONES

Tomando en cuenta los resultados y las conclusiones de este trabajo, se proponen las siguientes recomendaciones:

- ✍ Emplear el protocolo desarrollado en el presente trabajo para la propagación *in vitro* de *Morus alba* L. variedad Criolla
- ✍ Considerar los resultados de este trabajo para futuros estudios agronómicos de *Morus alba* L. variedad Criolla

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelnour, A. y A. Muñoz. 2005. Micropropagación de teca (*Tectona grandis* L.). Kurú: Revista Forestal. 2(5): 1-10.
- Aga, E. 2005. Molecular genetic diversity study of forest coffee tree (*Coffea arabica* L.) populations in Ethiopia. Implications for conservation and breeding. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Department of Crop Science. Sweden. 38 p.
- Aga, E. y T. Bryngelsson. 2006. Inverse sequence tagged repeat (ISTR) analysis of genetic variability in forest coffee (*Coffea arabica* L.) from Ethiopia. Genetic Resources and Crop Evolution. 53: 721-728.
- Agostini, G. y S. Echeverringaray. 2006. Micropropagation of *Cunila incisa* Benth. A potential source of 1,8-cineole. Revista Brasileira de Plantas Medicinales. Botucatu. 8: 186-189.
- Agramonte, D. 2000. Métodos biotecnológicos para la producción de semilla original de papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Cuba. 96 p.
- Agramonte, D.; J. Pérez, M. Pérez y A. Pérez. 1993. Empleo del hipoclorito de sodio (NaOCl) en sustitución del flameo en el cultivo de tejidos. Centro Agrícola. 2: 88-89.
- Agramonte, D.; F. Jiménez, M. A. Dita. 1998. Aclimatización. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Pérez, J. N. (ed.). Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba. pp. 193-206
- Agramonte, D.; L. Delgado, A. Trocones, M. Pérez, D. Ramírez y O. Gutiérrez. 2001. Micropropagación de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden a partir de segmentos nodales. Biotecnología Vegetal. 1(2): 109-114.
- Ahloowalia, B.S.; J. Prakash, V.A. Savangikar y C. Savangikar. 2004. Plant tissue culture. In: Low costs options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a technical meeting organized by the joint FAO/IAEA. Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and Held. Vienna. pp. 3-10.
- Aitken-Christie, J. 1991. Automation. In Debergh P.C. y R.J. Zimmerman (eds.). Micropropagation: technology and application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands. pp. 363-388.
- Aitken-Christie, J. 1995. Automation in plant tissue culture. General introduction and overview. En: Automation and environment control in plant tissue culture. Aitken-

- Christie, J.; T. Kozai y M.A.L. Smith (eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp. 1-19
- Almeida, J.E. y T. Canto. 2002. Mulberry germoplasm and cultivation in Brazil. In: Sánchez, M.D. (ed.). Mulberry for Animal Production. FAO Animal Production and Health Paper 147. Rome, pp. 73-95.
- Aloni R. 2001. Foliar and axial aspects of vascular differentiation: Hypotheses and evidence. *Journal of Plant Growth Regulators*. 201: 22–34.
- Alvard, A.; F. Cote y C. Teisson. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 32: 55-60.
- Anis, M; M. Faisal y S.K. Singh. 2003. Micropropagation of mulberry (*Morus alba* L.) through *in vitro* culture of shoot tip and nodal explants. *Plant Tissue Culture*: 13(1): 47-51.
- Aravanopoulos, F.A. 2003. Molecular identification of micropropagated plants. *Acta Horticulture*. ISHS. 616. pp. 25-47.
- Arnold, S. y T. Erickson. 1994. Effect of agar concentration on growth and anatomy of adventitious shoots in *Picea abies* L.. Kartst. *Plant Cell Tissue Culture*. 3: 257-264.
- Arredondo, A. 2000. Establecimiento de cadenas proliferativas y enraizamiento *in vitro* de *Junglans regia* L. a partir de embriones. Memoria de Título. Universidad de Concepción. Chile. 55 p.
- Arya, I.D.; S. Sharma, S. Chauhan y S. Arya. 2009. Micropropagation of superior *Eucalyptus* hybrids FRI-5 (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn. x *E. tereticornis* Sm.) y FRI-14 (*Eucalyptus torelliana* F.V. Muell. x *E. citriodora* Hook.): A comercial multiplication and field evaluation. *African Journal of Biotechnology*. 8(21): 5718-5726.
- Awasthi, A.; G.M. Nagaraja, G.V. Naik, S. Kanginakudru, K. Thangavelu y J. Nagaraju. 2004. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. *BMC Genetics*. 5: 1-9.
- Balakrishnan, V.; M. Ram Latha, K.C. Ravindran y J. Philip Robinson. 2009. Clonal propagation of *Morus alba* L. through nodal and axillary bud explants. *Botany Research International*. 2(1): 42-49.
- Basail, P.M. 2005. Multiplicación en sistemas de inmersión temporal del cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAAB). Tesis presentada en opción al título académico de Magister Scientiae en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. Cuba. 75 p.

- Beadle, C.L.; M.M. Ludlow y J.L. Honeysett. 1993. Water relations. In: photosynthesis and production in a changing environment: A field and laboratory manual. Hall, D.O.; J.M.O. Scurlock; H.R. Bolhar-Nordenkamp; R.C. Leegood y S.P. Long (eds.). Chapman and Hall. London. pp. 113-128.
- Benavides, J.E. 1991. Integración de árboles y arbustos en sistemas de alimentación para cabras en América Central: un enfoque agroforestal. *El Chasqui*. Costa Rica. 25: 6-36.
- Benavides, J.E. 1995. Manejo y utilización de la morera (*Morus alba* L.) como follaje. *Agroforestería en las Américas*. 2(7): 27-30.
- Benavides, J.E. 2000. La morera, un forraje de alto valor nutricional para la alimentación animal en el trópico. *Pastos y Forrajes*. 23: 1-14.
- Benavides, J.E. 2002. Utilization of mulberry in animal production systems. In: Sánchez, M.D. (ed.) 2002. *Mulberry for Animal Production*. FAO Animal Production and Health Paper 147. Roma, pp. 301-340.
- Benavides, J.E.; M. Lachaux y M. Fuentes. 1994. Efecto de la aplicación de estiércol de cabra en el suelo sobre la calidad y producción de biomasa de morera (*Morus sp.*) En: J.E. Benavides (ed.). "Árboles y arbustos forrajeros en América Central". Vol II. Serie técnica. Informe técnico No. 236. CATIE. Turrialba, Costa Rica. pp. 495-514.
- Benedetta, Ch.; P. Germana y M.A. Germana. 2007. In vitro response of two Sicilian genotypes of *Morus* (L.) through axillary bud culture. *Caryologia*. 60(1-2): 178-181.
- Bennici, A.; M. Anzidei y G.G.. Vendramin. 2004. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. Regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. *Plant Science*. 166: 221-227.
- Berg, J.M.; J.L. Tymoczko y L. Stryer. 2002. *Biochemistry*. 5th Edition. W.H. Freeman and Company. New Cork. pp. 491-596.
- Bernal, V.A. 2001. Empleo de los sistemas de inmersión temporal para la producción de vitroplantas de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). Tesis presentada en opción al título académico de Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal. Universidad Central de las Villas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. Cuba. 50 p.
- Berthouly, M. y H. Etienne. 2005. Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En: Hvoslef-Eide, A.K. y W. Preil. (eds.). *Liquid culture system for in vitro plant propagation*. Springer. Netherlands. pp. 165-195.

- Berthouly, M.; M. Dufour, D. Alvard, C. Carasco, I. Alemano y C. Teisson. 1995. Coffee micropropagation in a liquid medium using the temporary immersion technique. En: ASIC publishers (eds.). 16th International Scientific Colloquium on Coffee. Japan. pp. 514-519.
- Bhalla, S.; J. Ong Abdullah, S. Sreeramanan y C. Karuthan. 2009. Shoots induction from *Hibiscus rosa-sinensis* nodal explant using N⁶-benzylaminopurine (BAP). Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 5(4): 403-410.
- Bhattacharya, E. y S.A. Ranade. 2001. Molecular distinction amongst varieties of mulberry using RAPD and DAMD profiles. BMC Plant Biology. 1:3-10.
- Bhattacharya, E.; S.B. Dandin y S.A. Ranade. 2005. Single primer amplification reaction methods reveal exotic and indigenous mulberry varieties are similarly diverse. Journal of Biosciences. 30(5): 669-677.
- Bhau, B.S. and A.K. Wakhlu. 2001. Effect of genotype, explant type and growth regulators on organogenesis in *Morus alba*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 66: 25-29.
- Bhau, B.S. and A.K. Wakhlu. 2003. Rapid micropropagation of five cultivars of mulberry. Biologia Plantarum. 46(3): 349-355.
- Biswas, M.K.; R. Islam y M. Hossain. 2008. Micropropagation and field evaluation of strawberry in Bangladesh. Journal of Agricultural Technology. 4: 167-183.
- Bortolotti, S.A.; M. Pasqual, A.L. Rezende y L. Ferreira. 2003. BAP e substratos na aclimatacao de plântulas de gloxinia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.) provenientes de cultura de tecidos. Lavras. 27(2): 255-260.
- Borges, Ch.; M. Pasqual, L. Ferreira y J.O. Cazeta. 2004. Micropropagation of fig (*Ficus carica* L.) "Roxo de Valinhos" plants. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 40: 471-474.
- Boschini, C.F. 2002. Nutritional quality of mulberry cultivated for ruminant feeding. In: Sánchez, M.D. (ed.). Mulberry for Animal Production. FAO Animal Production and Health Paper 147. Rome, pp. 115-122.
- Bricoli Bati, C.; G. Godino, D. Monardo y V. Nuzzo. 2006. Influence of propagation techniques on growth and yield of olive trees cultivars Carolea and Nocellara Etna. Scientia Horticulturae. 109: 173-182.
- Burgess, K.S.; M. Morgan, L. Deverno y B.C. Husband. 2005. Asymmetrical introgression between two *Morus* species (*M. alba*, *M. rubra*) that differ in abundance. Molecular Ecology. 14: 3471-3483.

- Cabasson, C., D. Alvard, D. Dambier, P. Ollitrault y C. Teisson. 1997. Improvement of Citrus somatic embryos development by temporary immersion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 50: 33-37.
- Cabrera, J.M.; R. Gómez, M. Basail, A. Santos, V. Medero, J. López, A. Rayas, M. García y J.C. Ventura. 2005. Production of yam microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 83: 103-107.
- Capellades, M.; R. Lemeur and P. Debergh. 1991. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in rosa cultured *in vitro*. *Plant cell Tissue and Organ Culture*. 25: 21-26.
- Capote, M.; J. Valdéz y N. Rodríguez. 2007. Comparación de los marcadores moleculares isoenzimas, AFLP e ISTR para la estimación de nivel de polimorfismo, capacidad de discriminación e informatividad en cultivares de mango (*Mangifera indica* L.). Instituto de Investigaciones en Agricultura Tropical. La Habana.
- Cappelozza, L. 2002. Mulberry germoplasm resources in Italy. En: Sánchez, M.D. (ed.). *Mulberry for Animal Production*. FAO Animal Production and Health Paper 147. Rome, pp. 97-101.
- Cañal, M.; R. Rodríguez, B. Fernández, R. Sánchez-Tames y J.P. Majada. 2001. Fisiología del cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*. 1: 3-9.
- Castro, D. 2001. Propagación mixotrófica de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden en biorreactores de inmersión temporal. Tesis para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila. Centro de Bioplasmas. Cuba.
- Castro, D y J. González. 2002. Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. *Agricultura Técnica*. 62(1): 68-78.
- Castro, D y J. González. 2005. Cultivo mixotrófico de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en biorreactores de inmersión temporal. Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal. Centro de Bioplasmas. Versión digital. pp. 545-553.
- Chakraborti, K.; B.N.R. Vijayan y S.M.H. Qadri. 1998. *In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). Central Sericultural Research and training Institute. West Bengal. India. Abstract Volume Issue. 17: 799-803.
- Chang, R.Y., L.S. O'Donoghue y T.E. Bureau. 2001. Inter-MITE polymorphism (IMP): a high throughput transposon based genome mapping and fingerprinting approach. *Theoretical and Applied Genetics*. 102:773-781.

- Cheliak, W.M. 1993. Clone identification. En: Clonal forestry: Genetic and Biotechnology. Ahuja, M.R. y W.J. Libby (eds.). Springer-Verlag. Berlin. pp. 101-109.
- Chengfu, L.; Z.Youzuo y Z.Yaozhou. 1996. Studies on RAPD in mulberry. Journal of Zhejiang Agricultural University. 22:149–151.
- Colmenares, M. y C. Giménez. 2003. Multiplicación *in vitro* de *Musa* spp. mediante inmersión temporal. Revista de la Facultad de Agronomía. (LUZ). 20: 468-477
- Dandin, S.B. y V.G. Naik. 2004. Biotechnology in mulberry (*Morus* spp.). Crop improvement: research directions and priorities. En: Plant Biotechnology and Molecular Markers. Srivastava, P.S.; A. Narula y S. Srivastava. (eds.). Anamaya Publishers. New Delhi. India. pp. 206-216.
- Datta, R. K. 2002. Mulberry cultivation and utilization in India. En: Sánchez, M.D. (ed.). Mulberry for Animal Production. FAO Animal Production and Health Paper 147. Rome, pp. 45-60.
- De Lima, N.A., M. Oropeza, A. Perez y I.E. Trujillo. 2006. Análisis de la estabilidad genética de plantas de *Stylosanthes capitata* Vog., regeneradas *in vitro* utilizando marcadores RAPDs. Agronomia Tropical. 56(4): 663-675.
- De Rezende, A.L.; A.B. Da Silva y M. Pasqual. 2000. Aclimação de plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha* Wendl) obtidas *in vitro*: efeitos do substrato. Ciência Agrotecnologia Lavras 24(1):9-12.
- Debergh, P.C. 1991. acclimatization techniques of plant from *in vitro*. Plant Biotechnology. Acta Horticulturae. 289: 271-299.
- Delgado, F.L.A. 2000. Micropropagación de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden a partir de segmentos nodales de árboles seleccionados. Tesis presentada en opción al título académico de Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal. Universidad Central de las Villas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. 53 p.
- Demey, J.R.; E. Gamez, S. Molina y D. Infante. 2004. Comparative study of the discriminating capacity of AFLP and ISTR markers for genetic analysis of *Agave fourcroydes*. Plant Molecular Biology Reporter. 22: 29-35.
- Denng, R. y D.J. Donnelly. 1993. *In vitro* hardening of red raspberry through CO₂ enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. Can. J. Plant Sci. 73: 1105-1113.
- Desjardins, Y. 1995. Factors affecting CO₂ fixation in striving to optimize photoautotrophy in micropropagated plantlets. Plant Tissue Culture and Biotechnology. 1(1): 13-23.

- Díaz, L.P.; L.F. Medina, J. Latife, P.A. Dignonzelli y S.B: Sosa. 2004. Aclimatación de plantas micropropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz. RIA. 33(2): 115-128.
- Dirr, M.A. 1990. Manual of woody landscape plants: their identification, ornamental characteristics, culture, propagation, and uses. 4th ed. Stipes Publishing Co., Champaign, Illinois.
- Dixon, R. A. 1994. Plant cell culture. A practical approach. IRL Press Oxford University. New York. 230 p.
- Domínguez, A.; E. Telles y J. Revilla. 2001. Comportamiento inicial de dos especies de morera en fase de establecimiento. Pastos y Forrajes. 24: 203-208.
- Dottin, M.P. 2000. Propagación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schoff) Tesis presentada en opción al grado científico de doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de las Villas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. 119 p.
- Doyle, J.J. y J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin. 19: 11-15.
- Edwards, D.; J. Coghill, J. Batley, M. Holdsworth y K.J. Edwards. 2002. Amplification and detection of transposon insertion flanking sequences using fluorescent AFLP. Biotechniques. 32: 1090–1097.
- Ella, A., C. Jacobsen, W.W. Stür y G.L. Blair. 1989. Effect of plant density and cutting frequency on the productivity of four tree legumes. Tropical Grasslands, 23: 28-34.
- Escalona, M.; J.C. Lorenzo; B. González; M. Daquinta; J.L. González; Y. Desjardins y C.G. Borroto. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) Micropropagation in temporary immersion systems. Plan Cell Reports. 18: 743-748.
- Espinoza, E. 1996. Efecto del sitio y de la fertilización nitrogenada sobre la producción y calidad de la biomasa de tres variedades de Morera (*Morus alba* L.). Tesis presentada en opción al título académico de Magíster Scientiae. CATIE. Costa Rica. 86 p.
- Espinosa, A.C.; P.M. Pijut y Ch.H. Michler. 2006. Adventitious shoots regeneration and rooting of *Prunus serotina* Ehrh. *in vitro* cultures. HortScience. 41(1): 193-201.
- Etienne, H., B. Bertrand, F. Anthony, F. Cote y M. Berthouly. 1997a. L'embryogenese somatique: un outil pour l'amélioration genetique du cafeier. En: ASIC publishers (eds.). 17th International Scientific Colloquium on Coffe. Nairobi. pp. 457-465.
- Etienne, H., M. Lartaud, N. Michaux-Ferriere, MP Carron, M. Berthouly y C. Teisson. 1997b. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull. Aug.) using

- the temporary immersion technique. *In vitro Cellular and Development Biology-Plant*. 33: 81-89.
- Ettiène-Barry, D., B. Bertrand, N. Vasquez y H. Etienne. 1999. Direct sowing of *Coffea arabica* L. somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plant. *Plant Cell Reports*. 19: 111-117.
- Etienne, H. y M. Berthouly. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*. 69: 215-231.
- FAO. 1990. Sericulture training manual. FAO Agricultural Services Bulletin No.80, Rome, 117p.
- Flavell, A.J.; M.R. Knox, S.R. Pearce y T.H.N. Ellis. 1998. Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. *Plant. J.* 16: 643–650.
- García, M; M. Prieto; Y. Lugo; I. Miliam y L. Cepero. 2002. Estudios preeliminares sobre micropropagación de *Morus alba* L. Una nueva contribución para el ecosistema ganadero. Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”. Matanzas. Cuba.
- García, L.M.R.; L. Junco, A.L. Noda y D. Lorenzo. 2004. Aclimatización de vitroplantas de tres especies del género *Eucalyptus*. *Avances CIGET*. Volumen 4. Número 4.
- García, D.; Y. Noda, M. Medina, G. Martín y M. Soca. 2006. La morera: una alternativa viable para los sistemas de alimentación animal en el trópico. *Avances de Investigación Agropecuaria (AIA)*. 10(1): 55-72.
- García, D.R.; P.E. Lara, H.F. Magaña, E. Aguilar y J.R. Sanginés. 2009a. Parámetros reproductivos en conejas alimentadas con morera (*Morus alba* L.) o tulipan (*Hibiscus rosasinesis*). *Revista Verde*. 4(3): 90-98.
- García, D.E.; M.G. Medina, P. Moratinos, A. Torres, L.J. Cova, D. Perdomo y O. Santos. 2009b. Potencial forrajero para cabras de veinte especies leñosas en el estado Trujillo, Venezuela. *Zootecnia Tropical*. 27(3): 221-232.
- George, E. 1996. Plant propagation by tissue culture. Part 2. The Technology (ed.). Exegetics Limited. Edington, Wilts. England. pp. 639-650.
- Gnanam, R. 2004. Micropropagation of mulberry using shoot tip (or) nodal segments. *Proceedings of Indian Academy*.
- Gómez, K.R.; L.A. Barranco, C. Villalobos, J. Sandoval, B. Chong, D. Daniels y M. Reyes. 2002. Estudio en campo de la estabilidad genética y el efecto del cultivo *in vitro* sobre los componentes de rendimiento de plantas regeneradas vía embriogénesis somática en medios de cultivo líquidos. En: *Acrobat. XV Reunión*. Medellín. Colombia. Pp. 59-67.

- Gong, L.; D.J. Ren y Y. Wang. 1995. Studies on the solar energy utilization of mulberry fields with different planting densities. *Sericologia*. 35(3): 497-505.
- González, E.; D. Delgado y O. Cáceres. 1998. Rendimiento, calidad y degradabilidad ruminal potencial de los principales nutrientes en el forraje de morera (*Morus alba* L.). III Taller Internacional Silvopastoril "Los árboles y arbustos en la ganadería". Memoria. Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey". FAO. Matanzas, Cuba. pp. 69-72.
- González, J.L.; R. Rodríguez; y M. Escalona. 1999. Caracterización de las condiciones de cultivo *in vitro* y la aclimatización de plántulas de piña y caña de azúcar. En: Biotecnología Vegetal. Libro de reportes cortos. V Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. Universidad Central de las Villas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. Cuba. pp. 174-175.
- González, G.; S. Alemán y D. Infante. 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. II: selection among individual in a clonally propagated population. *Plant Science*. 165: 595-601.
- Gravina, A. 1995. Introducción al cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Universidad de la República de Uruguay. 32 p.
- Habib, A.; M.R. Ali; M.N. Amin y M.M. Arman. 2003. Clonal propagation of white mulberry (*Morus alba* L.) using *in vitro* technique. *Journal of Biotechnological Sciences*. 3(12): 1181-1187.
- Hamad, A.M. y R.M. Taha. 2008. Effect of sequential subcultures on *in vitro* proliferation capacity and shoot formations pattern of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) over different incubation periods. *Scientia Horticulturae*. 117: 329–334.
- Harizanis, P.C. 2007. Manual of Sericulture. Silkworm rearing. Mulberry cultivation. Agricultural university of Athens. Athens. 22 p.
- Hassanein, A.M.; A.A. Galal y M.M. Azooz. 2003. Interaction between time of nodal explant collection and growth regulators determines the efficiency of *Morus alba* L. micropropagation. *Journal of Plant Biotechnology*. 5(4): 225-231.
- Hazarika, B.N. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*. 85(12): 1704-1712.
- Hazarika, B.N. 2006. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*. 108: 105-120.

- Henríquez, M.E.A. 2004. Evaluación de tres factores de enraizamiento en estacas de morera (*Morus alba* L.). Memoria para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. 77 p.
- Hernández, A.; M. Ascanio, A. Cabrera, M. Morales, N. Medina y R. Rivero. 2003. Nuevos aportes a la clasificación genética de los suelos en el ámbito nacional e internacional. Instituto de Suelos. Ministerio de la Agricultura. AGRINFOR. Ciudad Habana. Cuba.
- Hernández, D.; H.A. Cruz, P.M. Cobos, J. Pérez, M. González, M.E, Ortega y C.A. Contreras. 2004. Valor nutritivo del forraje de morera (*Morus alba* L.) y tulipán (*Hibiscus rosasinesis*) cosechados a tres frecuencias de corte. XXXVIII Congreso Nacional de Buiatría. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos A.C.
- Hirano, H. 1977. Evaluation of affinities in mulberry and its relatives by peroxidase isozyme technique. JARQ. 11: 228-233.
- Hirano, H. 1980. Thremmetological studies of protein variation in mulberry. Bulletin of Sericulture and Experimental Station. 36: 67-186.
- Hirano, H. y K. Naganuma. 1979. Inheritance of peroxidase isozymes in mulberry (*Morus* spp.). Euphytica. 28: 73-79.
- Hossain, M., Rahman, S.M., Zaman, A., Joader, O.I., Islam, R., 1992. Micropropagation of *Morus laevigata* Wall from mature trees. Plant Cell Reports. 11: 522–524.
- Hunter, R.L. y C.L. Markert. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. Science. 125: 1294-1295.
- Hvoslef-Eide, A.K.; C. Munster, R. Lyngved, P.H. Heyerdahl y O.A. Olsen. 2003. Liquid culture systems for plant propagation. Acta Horticulturae 625. 173-183.
- Ilan, A.; M. Zliv y A.H. Halevy. 1995. Propagation and corm development of *Brodiaea* in liquid cultures. Scientia Horticulturae. 63: 101-112.
- Infante, D.; G. González, L. Peraza y M. Keb-Llanes. 2002. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. Plant Science. 164: 223–30
- Infante, D.; S. Molina, J.R. Demey y E. Gámez. 2006. Asexual genetic variability in *Agavaceae* determined with inverse sequence tagged repeats and amplification fragment length polymorphism analysis. Plant Molecular Biology Reporter. 24: 205-217.
- Islam, R.; A. Zaman; O.I. Joader y A.C. Barman. 1993. *In vitro* propagation as an aid for cloning of *Morus laevigata* Wall. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 33: 339-341.
- Ivory, D.A. 1990. Major characteristics, agronomic features and nutritional value of shrubs and tree fodders. En: C. Devendra (ed.). Shrubs and tree fodders for farm animals. Proceedings of a workshop in Denpasar. Indonesia. pp. 22-38.

- Jain, A.K.; S.B. Dandin y K. Sengupta. 1990. *In vitro* propagation through axillary bud multiplication in different mulberry genotypes. Plant Cell reports. 8: 737-740.
- Jain, A.K.; A. Sarkar y R.K. Datta. 1996. Induction of haploid callus and embryogenesis in *in vitro* cultured anthers of mulberry (*Morus indica* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 44: 143-147.
- Jaramillo, C.J. 2006. Evaluación nutricional y agronómica de *Morus alba* L. y *Sambucus nigra* L. y su utilización en la alimentación de rumiantes y monogástricos. Revista de Investigación. 6(2): 189-197.
- Jegou, D; J.J. Waelpu y G. Brunshwig. 1994. Consumo y digestibilidad de la materia seca y del nitrógeno del follaje de Morera (*Morus* sp.) y Amapola (*Malvabiscus arboreus*) en cabras lactantes. En: J. E. Benavides (ed.). "Arboles y arbustos forrajeros en América Central". Vol. 1. Serie técnica. Informe técnico No. 236. Costa Rica. pp. 155-162.
- Jiménez, E. 1992. Micropropagación. Conferencias Primer Curso FAO-Francia-Cuba sobre técnicas modernas de mejoramiento y multiplicación de especies agámicas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara. p. 1.
- Jiménez, E. 1998a. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez, J.N. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara. pp. 13-24.
- Jiménez, E. 1998b. Cultivo de ápices y meristemos. En: Pérez, J.N. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara. pp. 45-56.
- Jiménez, E.; N. Pérez, M. de Fera, R. Barbón, A. Capote, M. Chávez, E. Quiala y J. Pérez. 1999. Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 59:19–23.
- Jiménez, T.F. 2000. Aclimatización de plantas *in vitro* y producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en casas de cultivo. Tesis de Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. 58 p.
- Jiménez, T.F.; D. Agramonte, J.N. Pérez, D. Ramírez, O. Gutiérrez y M. Pérez. 2001. Aclimatización de plantas *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. variedad Desiree. Biotecnología Vegetal. 1(2): 103-108.

- Jiménez, T.F. y D. Agramonte. 1997. Instructivo técnico para la aclimatización de vitroplantas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Informe Consejo Científico. pp. 5-6.
- Jiménez, R. y M. Caballero. 1990. El cultivo industrial de plantas en macetas. Ediciones Horticultura. Madrid. 664 p.
- Kabi, F. y F.B. Bareeba. 2008. Herbage biomass production and nutritive value of mulberry (*Morus alba* L.) and *Calliandra calothyrsus* harvested at different cutting frequencies. *Animal Feed Science and Technology*. 140: 178-190.
- Kalendar, R., T. Grob, M. Regina, A. Suoniemi y A. Schulman. 1999. IRAP & REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics*. 98: 704–711.
- Kaminek, M. 1992. Progress in the cytokinin research. *TIBTECH* 10. pp. 159-162.
- Kandasamy, K.I.; A.R. Siti-Suhaila y A.A. Rosilah. 2001. Micropropagation of *Shorea leprosula* Burck. using a temporary immersion system. Forest Research Institute Malaysia (FRIM), 52109 Kepong, Selangor, Malaysia.
- Kandyliis, K.; I. Hadjigeorgiou y P. Harizanis. 2009. The nutritive value of mulberry leaves (*Morus alba* L.) as a feed supplement for sheep. *Tropical of Animal Health and Production*. 41: 17-24.
- Kanwar, K.; B. Kaushal y D.R. Sharma. 2005. Assessment of genetic stability of micropropagated plants of *Morus alba* L. using molecular markers. *Acta Horticulturae* 696. ISHS. 2: 149-153.
- Kar, P.K.; P.P. Srivastava, A.K. Awasthi y S.R. Urs. 2008. Genetic variability and association of ISSR markers with some biochemical traits in mulberry (*Morus* spp.) genetic resources available in India. *Tree Genetics and Genomes*. 4: 75-83.
- Katagiri, K.; Y. Kunitomo, R.R. Davalos y E. Iwata. 1994. Hexaploids found in mulberry strains collected in México. *Journal of Sericultural Science Japanese*. 63: 425-426.
- Kavyashree, R. 2007. A repeatable protocol for *in vitro* micropropagation of mulberry variety S₅₄. *Indian Journal of Biotechnology*. 6: 385-388.
- Kawiak, A. y E. Lojkowska. 2004. Application of RAPD in the determination of the genetic fidelity in micropropagated *Drosera* plantlets. *In Vitro Cellular Development and Biology-Plant*. 40: 592-595.
- Kellogg, E.A. y N.D. Juliano. 1997. The structure and function of RuBisCo and their implications for systematic studies. *American Journal of Botany*: 84(3): 413-428.

- Kim, Y.M. y H.K. Moon. 2007. Regeneration of plant by somatic embryogenesis in *Pinus rigida* x *P. taeda*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 43: 335-342.
- Kirdmanee, Ch.; Y. Kitaya and T. Kozai. 1995a. Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*: anatomical comparisons. *Environmental Control in Plant Tissue Culture*. *Acta Horticulturae* 393.
- Kirdmanee, Ch.; Y. Kitaya y T. Kozai. 1995b. Rapid acclimatization of *Eucalyptus* plantlets by controlling photosynthetic photon flux density and relative humidity. *Environmental Control in Biology*. 33: 123-132.
- Kitto, S. L. 1997. Comercial micropropagation. *HortScience*. 32(6): 1-3.
- Kochko, A. y S. Hamon. 1990. A rapid and efficient method for the isolation of restriction DNA from plants of the genus *Abelmoschus*. *Plant Molecular and Biology Reporter*. 8: 3-7.
- Koyuncu, F. 2004. Morphological and agronomical characterization of native black mulberry (*Morus nigra* L.) in Sütcüler, Turkey. *FAO. International Plant Genetic Resources Institute. PGR Newsletter*. 138: 32-35.
- Krikorian, A.D. 1993. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En: Roca, W. M. y L. A. Mroginski (eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. CIAT. Cali. Colombia. pp. 41-77.
- Lakshmanan, V.; V. S.R. Venkataramareddy y B. Neelwarne. 2007. Molecular análisis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology*. 10(1): 106-113.
- Larson, C.G.; C. Gómez, M. Sánchez y D. Ríos. 2006. Inducción de caulogénesis indirecta en *Eucalyptus globulus*. *Bosque*. 27(3)_ 250-257.
- Leifert, C. y A.C. Cassels. 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*. 37(2): 133-138.
- Leiva, L.; J.L. López; Y. Jiménez y Y. Quiñónez. 2004. Inclusión de morera en piensos para cerdos en crecimiento y ceba. II Simposio Internacional sobre Ganadería Agroecológica. Las Tunas. Cuba. pp. 143-144.
- Leva, A. 2009. Morphological evaluation of olive plants propagated *in vitro* culture through axillary buds and somatic embryogenesis methods. *African Journal of Plant Science*. 3(3)37-43.

- Lichun, F.; Y. Guang Wei, Y. MaoDe, Z. Xiaoyong y X. Zhong Huai. 1997. Study of relationship among species in *Morus* L. using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Scientia Agricultura Sinica* 30: 52–56.
- Litwinczuk, W. 2004. Field performance of ‘Sanga sangana’ strawberry plants (*Fragaria x ananassa* Duch.) obtained by runner and *in vitro* through axillary and adventitious shoots. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. Series Horticulture*. Vol. 7. Issue 1.
- Litwinczuk, W.; G. Szozerba, y D. Wrona. 2005. Field performance of highbush blueberries (*Vaccinium x Corymbosum* L.) cv. Herbert propagated by cutting and tissue culture. *Scientia Horticulturae*. 106: 162-169.
- Lorenzo, J.C.; B.L. Gonzalez, M. Escalona, C. Teisson, P. Espinosa y C. Borroto. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 54: 197–200.
- Lorenzo, J.C.; E. Ojeda, A. Espinoza y C. Borroto. 2001. Field performance of temporary immersion bioreactor-derived sugarcane plants. *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant*. 37(6): 803-806.
- Lou, C.F.; Y. Zhang, Y.Z. y J.M. Zhou. 1998. Polymorphisms of genomic DNA in parents and their resulting hybrids in mulberry *Morus*. *Sericologia*. 38: 437–445.
- Luoranen, J.; J. Lappl, G. Zhang y H. Smolander. 2006. Field performance of hybrid aspen clones planted in summer. *Silva Fennica*. 40(2): 257-269.
- Lu, M.Ch. 2002. Micropropagation of *Morus latifolia* Poilet using axillary buds from mature trees. *Scientia Horticulturae*. 96: 329-341.
- Lucchesini, M.; A. Mensuali-Sodi, R. Massai y R. Gucci. 2001. Development of autotrophy and tolerance to acclimatization of *Myrtus communis* transplants cultured *in vitro* under different aeration. *Biologia Plantarum*. 44: 167-174.
- Machii, H. 1989. Isolation of total mulberry DNA. *Journal of Sericultural Science of Japan*. 58: 349-350.
- Machii, H., A. Koyama, H. Yamanouchi, K. Matsumoto, S. Kobayashi y K. Katagiri. 2000. A list of morphological and agronomical traits of mulberry genetic resources. *Misc. Publ. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci*. 29: 1-307.
- Machii, H., A., Koyama y H. Yamanouchi. 2002. Mulberry Breeding, Cultivation and utilization in Japan. In: Sánchez, M. D. (ed.). *Mulberry for Animal Production*. FAO Animal Production and Health Paper 147. Rome, pp. 63-71.

- Maciel, S.D.; J.A. Voltoni y E.L. Pedrotti. 2002. Enraizamiento *ex vitro* e aclimatizacão do porta-enxerto de maceira Marubakaido micropropagado. Revista Brasileira de Fruticultura. Jaboticabal. 24(2): 289-292.
- Majada, J.; M. Fal, R. Sánchez y R. Ramos. 1997. The effect of vitrification rate on proliferation and hiperhydricity of *Dianthus caryophyllus* L. *In vitro Cellular & Development Biology-Plant*. 33: 66-69.
- Malá J.; A. Gaudinova, P. Dobrev, J. Eder y M. Cvikrova. 2005. Role of phytohormones in organogenic ability of elm multiplied shoots. *Biologia Plantarum*. 50(1): 8-14.
- Martín, G. 2004. Evaluación de los factores agronómicos y sus efectos en el rendimiento y la composición bromatológica de *Morus alba* L. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Matanzas. Matanzas, Cuba. 95 p.
- Martin, G.; I. Yepes; I. Hernández y J.E. Benavides. 1998. Evaluación del comportamiento de cuatro variedades de morera (*Morus alba* L.) durante la fase de establecimiento. III Taller Internacional Silvopastoril "Los Árboles y Arbustos en la Ganadería". Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey". FAO. Matanzas. Cuba. pp. 92-96.
- Martin, G.; F. Reyes; I. Hernández y M. Milera. 2000. Estudios agronómicos realizados en *Morus alba* L. III Taller Internacional Silvopastoril "Los Arboles y Arbustos en la Ganadería". Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey". FAO. Matanzas. Cuba. pp. 200-204.
- Martin, G.; F. Reyes; I. Hernandez y M. Milera. 2002. Agronomic studies with mulberry in Cuba. In: Sánchez, M. D. (ed.). Mulberry for Animal Production. FAO Animal Production and Health Paper 147. Rome, pp. 103-113.
- Martín, G.; Y. Noda, G. Pentón, D.E. García, F. García, E. González, F. Ojeda, M. Milera, O. López, L. Ly, L. Leiva y J. Arece. 2007. La morera (*Morus alba* L.): una alternativa de interés para la alimentación animal. *Pastos y Forrajes*. 30 (número especial): 3-18.
- Martínez, R.; H. Azpiroz, J.L. Rodríguez, V. Cetina, M. Gutiérrez y J. Sahún. 2005a. Micropropagación clonal *in vitro* en *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus urophylla*. *Ra Ximhai*. 1(1): 111-130.
- Martínez, R.; H. Azpiroz, J.L. Rodríguez, V. Cetina y M. Gutiérrez. 2005b. Aclimatización de plantas obtenidas *in vitro* de *Eucalyptus urophylla* T. Blake y *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. *Ra Ximhai*. 1(3): 591-597.
- Martínez, M.C., M.I. Plata y H.E. Hopp. 2007. Identificación molecular de patrones genéticos en distintas muestras de arandino (*Vaccinium* sp.). *RIA*. 36(2)3-15.

- Martre, P.; D. Lacan, D. Just y C. Teisson. 2001. Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 67(1): 25-35.
- Maximova, S.N.; A. Young, S. Pishak y M.J. Guiltinan. 2008. Field performance of *Theobroma cacao* L. plants propagated via somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 44: 487-493.
- McAlister, B.; J. Finnie, M.P. Watt y F. Blakeway. 2005. Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forests (SA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 81: 347-358.
- Mederos, V.; R. Escobar, G. Gallegos, J. Tohme, Y. Beovidez, S. Rodríguez y R. Gómez. 2002. Determinación por AFL de la estabilidad genética de plantas de yuca obtenidas por embriogénesis somática y organogénesis. *Biotecnología Vegetal*. 2(4): 245-247.
- Medina R., M. Faloci, M.A. Marassi y L. Mroginski. 2000. Análisis isoenzimático de plantas micropropagadas de arroz (*Oryza sativa* L.). *Comunicaciones científicas y tecnológicas. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina*.
- Medina, R.; M. Faloci, M.A. Marassi y L.A. Mroginski. 2004. Genetic stability in rice micropropagation. *Biocell*. 28(1): 13-20.
- Mehrotra, S.; M.K. Goel, A.K. Kukreja y B.N. Mishra. 2007. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. *African Journal of Biotechnology*. 6(13): 1484-1492.
- Milera, M.; G. Martín, I. Hernández, T. Sánchez y E. Fernández. 2007. Resultados preliminares del forraje de *Morus alba* en la alimentación de vacas lecheras. *Revista Avances de Investigación Agropecuaria*. 11(2): 3-14.
- Milera, M.; T. Sánchez y G. Martín. 2010. *Morus* sp. para la alimentación de bovinos en desarrollo (Nota técnica). *Pastos y Forrajes*. 33(1): 1-8.
- Modgail, M.; K. Mahajan, S.K. Chakrabarty, D.R. Sharma y R.C. Sobti. 2005. Molecular analysis of genetic stability in micropropagated apple rootstock MM106. *Scientia Horticulturae*. 104(2): 151-160.
- Morales, C.; J. Corbera, V.M. Paneque y J.M. Calaña. 2008. Efecto del sustrato en la alcimatización del cultivo de anturio (*Anthurium andreanum*). *Cultivos Tropicales*. 29(3): 75-79.
- Moreno, F.; A. Márquez; A. Guerrero; C. Chacón y T.R. Preston. 2002. Árboles forrajeros promisorios para la producción agropecuaria, manejo y reproducción. En: Cárdenas, I.;

- D. Montón y C. Moreno (eds.). XIV Jornadas Técnicas de Ganadería. UNET. San Cristóbal. pp. 157-183.
- Moreno, F.A., A. Márquez y T.R. Preston. 2005. Cuatro métodos de propagación vegetativa de morera (*Morus alba* L.). Livestock research for Rural Development. Artículo No. 58. Volumen 17.
- Mroginski, L.A. y W. Roca. 1993. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. En: Roca, W. y L.A. Mroginski (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Colombia. pp. 19-40.
- Muñíz, L.; R. Piva, J.R. Ferreira, E. Alvez, R. Crayo y F.D. Pereira. 2008. Effects of cytokinins on *in vitro* development of autotrophism and acclimatization of *Annona glabra* L. In Vitro Cellular and Development Biology-Plant. 44: 128-135.
- Murashige, T. y F.S. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiology Plantarum. 15: 173-197.
- Murch, S.J.; Ch. Liu, R.M. Romero y P.K. Saxena. 2004. In vitro culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentiaujete*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 78: 63-68.
- Nagori, R. y S.D. Purohit. 2004. In vitro planted regeneration in *Annona squamosa* L. through direct shoot bud differentiation on hypocotyls segments. Scientia Horticulturae. 991: 89-98.
- Nelson, D.L. y M.M. Cox. 2005. Principles of Chemistry. 4th Edition. W.H. Freeman and Company. New York. pp. 631-655 y 690-750.
- Nguyen, Q.T.; T. Kozai, J. Heo y D.X. Thai. 2001. Photoautotrophic growth response of in vitro cultured coffee plantlets to ventilation methods and photosynthetic photon fluxes under carbon dioxide enriched condition. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 66: 217-225.
- Nirmalakumari. A. 2006. Mulberry (*Morus alba* L.) micropropagation. Madras Agriculture Journal. 93(1-6): 68-72.
- Noda, Y., G. Penton y G. Martín. 2003. Evaluación varietal de *Morus alba* L. durante la fase de vivero. V Taller Internacional sobre Recursos Fitogenéticos. Estación Experimental de Pastos y Forrajes Sancti Spiritus. Cuba. pp. 94-95.
- Noda, Y. y G. Martin. 2008. Efecto de la densidad de siembra en el establecimiento de morera para su inclusión en sistemas ganaderos. Zootecnia Tropical. 26(3): 339-341.
- Nuri, M.; Y. Bolek y N. Sevgin. 2010. The effects of explant and cytokinin type on regeneration of *Prunus macrocarpa*. Scientia Horticulturae. 126: 88-94.

- Obrador, P.; D. Hernández, E. Aranda, A. Gómez, W. Camacho y M. Cobos. 2007. Evaluación de los forrajes de morera (*Morus alba* L.) y tulipán (*Hibiscus rosasinensis*) a diferentes edades de corte como suplemento para corderos en pastoreo. *Universidad y Ciencia*. 23(2): 115-125.
- Ochoa, N.A. 1990. Establecimiento de cultivos *in vitro*. En: Rosell, C.H. y V.M. Villalobos. (eds.). *Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales*. FAO, Roma. p. 25-27.
- Olmos, S.; G. Lusiani y E. Galdeano. 2004. Micropropagación. En: V. Echenique, C. Rubinstein y L. Mroginski (eds.). *Biotechnología y mejoramiento vegetal. Parte V: Métodos de propagación y conservación de germoplasma*. Editorial INTA. Buenos Aires, Argentina. pp. 163-172.
- Orellana, P. 1995. Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis de Doctorado. Instituto de Biología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Cuba. 92 p.
- Orellana, P. 1998. Propagación vía organogénesis. En: Pérez, N.J. (ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por Biología*. Instituto de Biología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara. Cuba. pp. 151-178.
- Orhan, E.; S. Ericisli, N. Yildirim y G. Agar. 2007. Genetic variations among mulberry genotypes (*Morus alba*) as revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Plant Systematics and Evolution*. 265: 251-258.
- Osterc, G.; M. Zavrl Fras, T. Vodenik y Z. Luther. 2005. The propagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) nodal explants. *Acta Agriculturae Slovenica*. 85(2): 411-418.
- Oviedo, F.J.; J.E. Benavides y M. Vallejo. 1994. Evaluación bioeconómica de un módulo agroforestal autosostenible con cabras lecheras en Turrialba, Costa Rica. En: Benavides, J.E. (ed.). "Árboles y arbustos forrajeros en América Central". Vol II. Serie técnica. Informe técnico No. 236. CATIE. Turrialba, Costa Rica. pp. 601-630.
- Pahlares, G.A.; R. Rodríguez, M. Cid, D. Pina y J.L. González. 2004. Efecto de un análogo de brasinoesteroides (MH5) en la propagación de *Eucalyptus urograndis* en biorreactores de inmersión temporal. *Cultivos Tropicales*. 25(1): 39-44.
- Pan, Y.L. 2000. Progress and prospect of germplasm resources and breeding of mulberry. *Acta Sericologica Sinica*. 26(Supplement): 1-8.
- Panda, M.K.; S. Mohanty, E. Subudhi, L. Acharya y S. Nayak. 2007. Assessment of genetic stability of micropropagated plant of *Curcuma longa* L. By cytophotometry and RAPD analyses. *International Journal of Integrative Biology*. 1(3): 189-195.

- Panhwar, F. 2005. Acclimatization and establishment of micropropagation plants. ChemLin – Virtual Library Chemistry.
- Pattnaik, S.; Y. Sahoo y P.K. Chand. 1995. Efficient plant retrieval from alginate-encapsulated vegetative buds of mature mulberry trees. *Scientia Horticulturae*. 61: 227-239.
- Pattnaik, S.; Y. Sahoo y P.K. Chand. 1996. Micropropagation of a fruit tree *Morus australis* Poir. *Plant Cell Reports*. 15: 841-845.
- Pattnaik, S. y P.K. Chand. 1997. Rapid clonal propagation of three mulberries, *Morus cathayana* Hemsl., *M. lhoukoiz* and *M. serrata* Roxb., through *in vitro* culture of apical shoot buds and nodal explants from mature trees. *Plant Cell Reports*. 16: 503–508.
- Pattnaik, S. y P.K. Chand. 2000. Morphogenic response of the alginate-encapsulated axillary buds from *in vitro* shoot cultures of six mulberries. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 60: 177-185.
- Paz, R. y A. Villegas. 2009. Niveles de sacarosa en el enraizamiento *in vitro* y aclimatización *ex vitro* de plántulas del portainjerto de vid R110 (*Vitis rupestris* x *Vitis berlandieri*). *INTERCIENCIA*. 34(12): 897-902.
- Pelicano, A.; M.D. de Sesar, N. Zamuner, J.L. Danelón y M. Yoshida. 2007. Efecto de la propagación asexual y prolongación del periodo vegetativo de *Morus alba* L. en la producción de capullos de seda. *Ciencia e Investigación Agraria*. 34(2): 81-89.
- Pérez, J.N. 1997. Curso teórico práctico de propagación masiva de plantas. Santa Clara. Cuba. p. 2.
- Pérez, J.N. 1998. Variación somaclonal. En: Pérez, N.J. (ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara. Cuba. pp. 105-121.
- Pérez, A.N.L. 2001. Empleo de los sistemas de inmersión temporal para la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis presentada en opción al título académico de Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal. Universidad Central de las Villas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. Cuba. 66 p.
- Pérez, J.N.; E. Jiménez y D. Agramonte. 1998. Aumento en la eficiencia de la micropropagación. En: Pérez, N.J. (ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara. Cuba. pp. 179-190.
- Pérez, J.N., D. Agramonte, F. Jiménez y D. Ramírez. 1999. Informe final del proyecto “Desarrollo y perfeccionamiento de la propagación masiva en las fases III y IV,

- enraizamiento y adaptación en caña de azúcar, papa, plátanos y bananos y adaptación de semillas artificiales en caña de azúcar. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara. Cuba.
- Pescio, F.; H. Zunini, C.P. Basso, M.D. de Sesar, R.G. Frank, A.E. Pelicano y C.M. Vieites. 2006. Sericultura. Manual para la producción. Capítulo 3: Cultivo de la morera. Instituto Nacional de Tecnología Industrial. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. Argentina. pp. 37-64.
- Phillips, G.C. 2004. Invited review: *In vitro* morphogenesis in plants-Recent advances. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*. 40: 342-345.
- Piao, X.C.; D. Chakrabarty, E.J. Hahn y K.Y. Paek. 2003. A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system. *Current Science*. 84(8): 1129-1132.
- Pierik, R.L.M. 1994. Biotecnología vegetal como herramienta en la horticultura ornamental. *Chapigo*. 1: 45-57.
- Polanco, C. y M.L. Ruíz. 2002. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. *Plant Science*. 162: 817-824.
- Pospisilova, J.; I. Ticha, P. Kadlec, D. Haisel y S. Plzakova. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*. 42(4): 481-497.
- Pradhan, A.; A.S. Vishwanathan y R. Basavaraju. 2010. Effect of nutrients on *in vitro* culture of *Morus alba* L. (White mulberry). *Bioresearch Bulletin*. 1: 19-23.
- Preece, J.E. y E.G. Sutter. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. En: Deberg, P.C. y R.H. Zimmerman (eds.). *Micropropagation: Technology and application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 71-93.
- Quintero, R.R. 1996. Biotecnología y desarrollo sustentable. *Biotecnología Aplicada*. Revista de la Sociedad Iberoamericana de Biotecnología Aplicada a la Salud. *Elfos Scientiae*. 13(4): 299.
- Ramírez, V.M.; S. León y A. Urdaneta. 1999. Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) nierz. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*. 16: 243-255.
- Ramírez, I.M.; J.L. Fuentes, N.N. Rodríguez, J. Cueto, D. Becker y W. Rohde. 2002. DNA polymorphisms in cuban varieties of avocado (*Persea americana* Mill.) as detected by inverse sequence tagged repeat (ISTR) analysis. *Cultivos Tropicales*. 23(3): 85-88.

- Ravindran, S.; A. Rao; G. Naik; A. Tikader; P. Mukherjee y K. Thangavelu. 1997. Distribution and variation in mulberry germplasm. *Indian Journal Plant Genetic Research*. 10(2): 233-242.
- Reed, J. 1994. Características de las plantas tropicales que determinan el valor nutritivo. En: Homan, E.J. (ed). *Ganadería y recursos naturales en América Central: estrategias para la sostenibilidad*. CATIE, Turrialba. pp. 195-206.
- Robert, H. y J. Friml. 2009. Auxin and other signals on the move in plants. *Nature Chemical Biology*. 5(5): 325-332.
- Rodríguez, N.; W. Rohde, C. González, I.M. Ramírez, J.L. Fuentes, M.A. Roman, X. Xiqués, D. Decker y J.B. Velázquez. 2003a. Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de cultivares de aguacatero (*Persea americana* L.) en Cuba. *Proceedings of V World Avocado Congress*. pp. 47-53.
- Rodríguez, R.; M. Daquinta, J. Capote, D. Pina, Y. Lezcano y J.L. González. 2003b. Nuevos aportes a la micropropagación de *Swietenia macrophylla* x *Swietenia mahoganii* (caoba híbrida) y *Cedrela odorata* (cedro). *Cultivos Tropicales*. 24: 23-27.
- Rodríguez, N.; J.L. Fuentes, O. Coto, V.R. Fuentes, I.M. Ramírez, D. Becker, I. Rodríguez, C. González, X. Xiqués, M.I. Román, B. Velázquez, W. Rohde y R. Jiménez. 2007. Estudio comparativo de los niveles de polimorfismo, capacidad de discriminación e informatividad de los caracteres morfoagronómicos y de los marcadores AFLP, ISTR, SSR e isoenzimas en aguacatero. *Proceedings of VI World Avocado Congress*. Chile.
- Rohde, W. 1996. Inverse sequence tagged-repeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR-based technique for genome analysis in the plant and animal kingdom. *Journal of Genetics and Breeding*. 50: 249-261.
- Rohde, W.; Kullaya, A.; Rodríguez, J.; Ritter, E. 1995. Genetic analysis of *Cocos nucifera* L. by PCR amplification of spacer sequences separating a subset of copia-like EcorI repetitive elements. *Journal of Genetics and Breeding*. 49: 179-186.
- Rohde, W.; Becker, D.; Kullaya, A.; Rodríguez, J.; Herrán, A.; Ritter, E. 1999. Analysis of coconut germplasm biodiversity by DNA markers technology and construction of a genetic linkage map. En: *Current advances in coconut biotechnology*. Kluwer Academic publishers. pp. 99-121.
- Rohlf, F.J., 2000. NTSYS-PC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2. 11. Exeter Software, Setauket, New York, USA.
- Romero, F.; J. Benavides; M. Kass y M. Pezo. 1994. Utilización de árboles y arbustos en sistemas de producción de rumiantes. En: Homan, E.J. (ed.). *Ganadería y recursos*

- naturales en América Central: estrategias para la sostenibilidad. CATIE, Turrialba. pp. 207-220.
- Rout, G.R. y P. Das. 1997. *In vitro* organogénesis in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Journal of Herbaceous Species and Medicinal Plants. 4: 41-51.
- Rout, D.R.; G. Das, S. Samantaray y P. Das. 2000. *In vitro* micropropagation of *Lawsonia inermis* L. (Lythraceae). Plant Biotechnology Division. Bhubaneswar 751 015, Orissa, India.
- Ruzic, D.V. y T.I. Vujovic. 2008. The effect of cytokinin types and their concentration on *in vitro* multiplication of sweetcherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.). HortScience. (Praga). 35(1): 12-21.
- Sahoo, Y; S.K. Pattnaik y P.K. Chand. 1993. Micropropagation of mulberry using alginate encapsulated shoot buds. In vitro Cellular and Development Biology-Plant. 29(3): 90 A.
- Sahoo, Y; S.K. Pattnaik y P.K. Chand. 1997. Plant regeneration from callus cultures of *Morus indica* L. derived from seedlings and mature plants. Scientia Horticulturae. 69: 85-98.
- Salazar, R. y R.A. Hoyos. 2007. Multiplicación y tuberización *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistemas de inmersión temporal. Revista Facultad Nacional de Agronomía de Medellín. 60(2): 3907-3921.
- Salazar, R.; T.E. Vargas, E. García y M. Oropeza. 2005. Micropropagación y organogénesis de *Aster ericoides* cultivar "Monte Casino". Interciencia. 30(5): 295-299.
- Salvi, N.D.; L. George y S. Eapen. 2002. Micropropagation and field evaluation of micropropagated plant of tumeric. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 68(2): 143-151.
- Sánchez, M.D. 2002a. World distribution and utilization of mulberry and its potential for animal feeding. In: Sánchez, M. D. (ed.) 2002. Mulberry for Animal Production. FAO Animal Production and Health Paper 147. Rome, pp. 4-10.
- Sánchez, M.D. 2002b. Mulberry: an exceptional forage available almost worldwide. En: Sánchez M. D., (ed.) (2002). Mulberry for Animal Production. FAO Animal Production and Health Paper 147. Rome, pp. 301-313.
- Sánchez, M. 2006. Morera: un Forraje Excepcional Disponible Mundialmente. Artículos técnicos-Agricultura. Dirección de Producción y Sanidad Animal. FAO, Roma.
- Sánchez, L.F.; F. Quiroz, V. Loyola y D. Infante. 2003. Culture induced variation in plants of *Coffea arabica* cv. Caturra rojo, regenerated by direct and indirect somatic embryogenesis. Molecular Biotechnology. 23: 107-115.

- Sánchez, M.; D. Ríos, M. Pedraza, G. Pereira, H. Castellanos y R. Escobar. 2004. Propagación *in vitro* de *Nothofagus procera* (OPEP. Et Ende.) Oerst. a partir de embriones aislados. *Bosque*. 25(1): 123-128.
- Sanginés, G.J.R.; L.P.E. Lara; L.J.A. Rivera; L.L. Pinzón; T.O. Ramos; J. Murillo; M. Itra; C.C. Fuentes y G. Azcorra. 1999. Avances en los programas de investigación en morera (*Morus alba* L.) en Yucatán. I Congreso Internacional sobre Morera. Estación Experimental de Patos y Forrajes "Indio Hatuey". Matanzas. Cuba.
- Sastry, C.R., 1984. Mulberry varieties, exploitation and pathology. *Sericulture*. 24 (3): 333-359.
- Sensi, E.; R. Vignani, W. Rohde y S. Biricolti. 1996. Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. "Sangiovese" and "Colorino" genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. *Vitis*. 35: 183-188.
- Sharma, A.; R. Sharma y H. Machii. 2000. Assessment of genetic diversity in a *Morus* germoplasm collection using fluorescence based AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 1001: 1049-1055.
- Shayo, C.M. 1997. Uses, yield and nutritive value of mulberry (*Morus alba* L.) trees for ruminants in the semiarid areas of central Tanzania. *Tropical Grasslands*. 31: 599-604.
- Shelton, H.M. y J.L. Brewbaker. 1994. *Leucaena leucocephala* - the most widely used forage tree legume. En: R.C Gutteridge, and H.M. Shelton (eds.). *Forage Legumes in Tropical Agriculture*. pp. 15-29.
- Shim, S.W.; E.J. Hahn y K.Y. Paek. 2003. *In vitro* and *ex vitro* growth of grapevine rootstock '5BB' as influenced by number of air exchanges and the presence or absence of sucrose in culture media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 75: 57-62.
- Silva, J.; D. Giang y m. Tanaka. 2005. Novel micripropagation system for *Eucalyptus urograndis*. *Bragantia*. 64(3): 349-359.
- Singh, B. and H.P.S. Makkar. 2002. The potential of mulberry foliage as a feed supplement in India. En: Sánchez, M. D. (ed.) 2002. *Mulberry for Animal Production*. FAO Animal Production and Health Paper 147. Rome, pp.131-140.
- Singha, S.; E.C. Townsend y G.H. Oberly. 1995. Mineral nutrient status of crabapple and pear shoots cultured *in vitro* on varying concentrations of three commercial agars. *Journal of the American Society of Horticulture Science*. 110: 407-411.
- Simonton, W.; C. Robacker y S. Krueger. 1991. A programmable micropropagation apparatus using cycled medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 27: 211-218.

- Smith, M.A.L. y L.A. Spomer. 1995. Vessels, gels, liquid media and environmental control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. pp. 371-404.
- Snedecor, G.W. y W.G. Conchrad. 1968. Statistical methods. Oxford and IBH Publishers. New Delhi. Bombay. Calcutta.
- Sohn, K.W. 2003. Conservation status of sericulture germplasm resources in the world. I. Conservation status of mulberry (*Morus* spp.) genetic resources in the world. From papers contributed to expert consultation on promotion of global exchange of sericulture germplasm. FAO. Bangkok, Tailand. 197 p.
- Soniya, E.V., N.S. Banerjee y M.R. Das. 2001. Genetic analysis of somaclonal variation among callus-derived plants of tomato. *Current Science*. 80(9): 1213-1215.
- Sotolongo, R.; M. García, L. Junco, G. Geada y G. García. 2003. Micropropagación de *Psidium salutare* (H.B.K.) Borg. *Revista del Jardín Botánico Nacional*. 24(1-2): 245-250.
- SPSS. 2008. SPSS for Windows Release 16,0. Standar Version. SPSS Inc. Chicago, Illinois.
- Srivastava, S.; R. Kapoor, A. Thathola y R.P. Srivastava. 2006. Nutritional quality of leaves of some genotypes of mulberry (*Morus alba* L.). *International Journal of Food Science and Nutrition*. 57(5-6): 305-313.
- Steel, R. y J. Torrie. 1992. Bioestadística: principios y procedimientos. Segunda edición. Editorial McGraw Hill. 622 p.
- Sujathamma, P.; L. Chengfu y Y. Jinhou, 2007. Influence of growth regulators of winter bud explants of mulberry (*Morus* spp.) *in vitro*. *Indian Journal of Sericulture*. 46(1): 65-68.
- Susheelamma, K.; K.R. Sheekar; A. Sarkar; M.R. Rao y R.K. Datta. 1996. Genotype and hormonal effects on callus formation and regeneration in mulberry. *Euphytica*. 90: 25-29.
- Tacoronte, M.; M. Vielma, A. Mora y C. Valecillos. 2004. Propagación *in vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla* King.) a partir de yemas axilares. *Acta Científica Venezolana*. 55(1): 7-12.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. 3rd Edition. Sinaver Associates, Inc. Publishers. Sunderland Massachusetts. pp. 111-143.
- Takao, N. 2000. Cryopreservation of vegetatively propagated species (mainly mulberry). Tohoku National Agricultural Experimental Station. Arai. Fukushima. Japan.
- Talamucci, P.; A. Pardini y G. Argenti. 2002. Effects of grazing animals and cutting on the production and intake of a mulberry-subterranean clover association. En: Sánchez, M. D.

- (ed.) 2002. Mulberry for Animal Production. FAO Animal Production and Health Paper 147. Rome, pp.198-206.
- Tani, N.; H. Yoshimaru, T. Kawahara, Y. Hoshi, F. Nobushima y T. Yasui. 2006. Determination of the genetic structure of remnant *Morus boninensis* Koidz. Trees to establish a conservation program on the Bonin Islands, Japan. BMC Ecology. 6:14.
- Teisson, C. y D. Alvard. 1994. *In vitro* production of potato micro tuber in liquid medium using temporary immersion. Potato Research. 42: 499-504.
- Tellería, T. y R. Jiménez. 1989. Cultivos hidropónicos. Elementos tecnológicos. 78 p.
- Thomas, D. 2002. Advances in Mulberry Tissue Culture. Journal of Plant Biology. 45(1): 7-21.
- Tikader, A. y C.K. Kamble. 2008. Mulberry wild species in India and their use in crop improvement. A review. Australian Journal of Crop Science. 2(2): 64-72.
- Tikader, A.; S. Roychoudhury; A.K. Mishra y C. Das. 1993. Foliage yield of different varieties of mulberry (*Morus* spp.) grown at two spacings at Hills of West Bengal. Indian Journal of Agricultural Sciences, 63: 36-37.
- Todaro, M.; A. Sinacon, G. Marinaro, M.L. Alicata y P. Giaccone. 2007. Palatability and *in vivo* digestibility of mulberry leaves (*Morus latifolia* cv. Kokusou 21) in sheep feeding. Journal of Animal and Veterinary Advances. 6(4): 509-512.
- Toral, O.; L. Simón y Y. Matías. 1999. Caracterización de la morera en condiciones de *arboretum*. I Congreso Internacional sobre Morera. Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey". Matanzas. Cuba.
- Toro, B. 2003. Protocolo de micropropagación para el cultivar Carmenere (*Vitis vinifera* L.) con la finalidad de su utilización en un programa de certificación de plantas libres de virus. Tesis, Magíster en Ciencias Vegetales. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. 40 p.
- Torres, M.I.; M.M. Morales y A. Santerre. 2005. Antecedentes de variación somaclonal en *Agave tequilana* Weber variedad Azul proveniente de la micropropagación. Avances en la investigación científica en el CUCBA 2005. pp. 204-206.
- Torres, M.I.; M.M. Morales, L. de la Cruz y A.R. Villalobos. 2006a. Identificación de polimorfismo entre hijuelos y plantas micropropagadas de *Agave tequilana* y *Agave cocui* usando ISTRs. Scientia-CUCBA. 8(2): 203-206.
- Torres, J.; L. Laskowski y M.E. Sanabria. 2006b. Efecto del ambiente de desarrollo sobre la anatomía de la epidermis foliar de *Cattleya jenmanii* Rolfe. Bioagro. 18(2): 93-99.

- Tran Thanh Van, K. y T.H. Trinh. 1990. Organogenic differentiation. In: Bhojwani, S.S. (ed.). Plan Tissue Culture. Application and Limitations. Elsevier, Amsterdam. pp. 34-53.
- Trigueros, R.O. y Villalta, P. 1997. Evaluación del uso de follaje deshidratado de morera (*Morus alba*) en alimentación de cerdos de la raza Landrace en etapa de engorde. Resultados de Investigación, CENTA, El Salvador. pp. 150-155.
- Trocones, A.G. 2000. Micropropagación de *Hibiscus elatus* Sw. a partir de árboles seleccionados. Tesis presentada en opción al título académico de Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal. Universidad Central de las Villas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. Cuba. 66 p.
- Umate, P.; K. Rao, K. Kiranmayee, T. Sree y A. Sadanandam. 2005. Plant regeneration of mulberry (*Morus indica* L.) from mesophyll-derived protoplasts. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 82(3): 289-293.
- Urbina, E.; G. Baca, R. Núñez, M. Colinas, L. Tijerina y J. Tirado. 2006. Cultivo hidropónico de plántulas de jitomate en zeolita cargada con K^+ , Ca^{2+} o Mg^{2+} y diferente granulometría. Agrociencia. 40(4): 419-429.
- Uribe, T.F. 2002. Mulberry for rearing dairy heifers. En: Sánchez, M. D. (ed.) Mulberry for Animal Production. FAO Animal Production and Health Paper 147. Rome, pp. 203-206.
- Uribe, M. y L. Cifuentes. 2004. Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en la propagación de *Legrandia concinna*. Bosque. 25(1): 129-135.
- van Huylbroeck, J.M. y P.C. Debergh. 1996. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. Physiological Plant. 96: 298-304.
- van Huylbroeck, J.M.; A. Piqueras y P.C. Debergh. 1997. Effects of light intensity on photosynthesis and toxic O_2 scavenging enzymes during acclimatization of micropropagated *Calathea*. Phytan Special Issue: "Free Radicals". 37: 283-290.
- Vardja, R. y T. Vardja. 2001. The effect of cytokinin type and concentration and the number of subcultures on the multiplication rate of some decorative plants. Proceedings of Estonian Academy of Science, Biology and Ecology. 50(1): 22-32.
- Vargas, S.; J. Reyes; R. Franco y D. Suárez. 2002. Diseño productivo de conejos en crecimiento alimentados con morera (*Morus alba* L.) y follaje de boniato (*Ipomea batatas*). II Congreso de Cunicultura de las Américas. La Habana. Cuba. pp. 152-155.
- Velázquez, M.; M.A. Gutiérrez; A. Arias y C. Rodríguez. 1994. El forraje de morera (*Morus alba* L.) como suplemento en dietas de ensilado de sorgo (*Sorghum bicolor* x *Sorghum*

- sudanense*) para novillos. En: J.E. Benavides (ed.). Árboles y arbustos forrajeros en América Central. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1: 377-392.
- Venkatachalam, L., R.V. Sreedhar y N. Bhagyalakshmi. 2007. Genetic analyses of micropropagated and regenerated plantlets of banana as assessed by RAPD and ISSR markers. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 43: 267-274.
- Venkateswaralu, M.; B.N. Susheelamma, N. Suryanarayana, N.K. Dwivedi y K. Sengupta. 1989a. Peroxidase isozyme banding patterns in aneuploids of mulberry. *Sericologia*. 29: 99-104.
- Venkateswaralu, M.; B.N. Susheelamma, N. Suryanarayana y K. Sengupta. 1989b. Peroxidase isozyme Studies in four mulberry species introduced from Indonesia. *Indian Journal of Sericulture*. 28: 271-273.
- Venkateswaralu, M.; B.N. Susheelamma, M.V. Rajan, P.K. Tawary y A. Sarkar. 1995. Peroxidase isozyme studies in triploids of mulberry (*Morus* spp.). *Indian Journal of Sericulture*. 34: 153-155.
- Ventura, J.; V. Madero; J. López; M. García; S. Rodríguez; J. García y D. Reinaldo. 1998. Manejo de los explantes en inmersión temporal, clon de banano FHIA 18. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. FAO. Cuba. p. 64.
- Vidales, I. 2002. Efecto de los reguladores de crecimiento en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática en aguacate (*Persea americana* Mill.). Tesis de Doctorado. Universidad de Colima. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Colima, México. 138 p.
- Viera, C.J.; M.A. Ibrahim y O.L. Flores. 1998. Avances de la investigación de morera (*Morus spp.*) para la alimentación de rumiantes. Experiencias en CATIE. III Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica. Valencia, España. pp. 469-477.
- Vijayan, K. y G. Padmaja. 1999. Clonal propagation of mulberry (*Morus indica* L. Cultivar M-5) through *in vitro* culture of nodal explants. *Scientia Horticulturae*. 80: 289-298.
- Vijayan, K. y G. Padmaja. 2002. Seasonal influence on axillary bud sprouting and micropropagation of elite cultivars of mulberry. *Scientia Horticulturae*. 92: 55-68.
- Vijayan, K. y G. Padmaja. 2005. Shoot regeneration via direct organogenesis from *in vitro* derived leaves of mulberry using thidiazuron and 6-benzylaminopurine. *Scientia Horticulturae*. 106: 593-602.
- Vijayan, K.; A.K. Awasthi, P.P. Srivastava y B. Saratchandra. 2004. Genetic analysis of indian mulberry varieties through molecular markers. *Hereditas*. 141:8-14.

- Vijayan, K.; P.P. Srivastava y A.K. Awasthi. 2004a. Analysis of phylogenetic relationship among five mulberry (*Morus*) species using molecular markers. *Genome*. 47: 439-448.
- Vijayan, K.; A.K. Awasthi. P.P. Srivastava y B. Saratchndra. 2004b. Genetic analysis of Indian mulberry varieties through molecular markers. *Hereditas*. 141: 8-14.
- Vijayan, K.; A. Tikader, P.K. Kar, P.P. Srivastava, A.K. Awasthi, K. Thangavelu y B. Saratchandra. 2006. Assessment of genetic relationship between wild and cultivated mulberry (*Morus*) species using PCR based markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 53: 873-882.
- Villalobos V.M. y T.A. Thorpe. 1993. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca, W.M. y L.A. Mroginski (eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. CIAT. Cali, Colombia. pp. 127-141.
- Weising, K.; H. Nybom, K. Wolff y G. Kahl. 2005. *DNA Fingerprinting in Plants. Principles, Methods, and Applications*. Second edition. Taylor & Francis Group, CRS Press, New York.
- Welters, P. y A. Muller. 2007. *Phytoanalysis*. Phytowelt Green Technologies. 2 p.
- Xuan Ba, N. y N. Le Duc. 2003. Evaluation of some unconventional trees/plants as ruminant feeds in Central Vietnam. En: Preston, R. y Ogle, B. (eds.). *Proceedings of Final National-Workshop on Sustainable Livestock Production on Local Feed Resources*. Hue, City.
- Yadav, U.; M. Lal y V.S. Jaiswal. 1990. Micropropagation of *Morus nigra* L. From shoot tip and nodal explants of mature trees. *Scientia Horticulturae*. 44: 61-67.
- Yamashita, T. y R. Ohsawa. 1990. Quantitative investigation on nitrogen metabolism in mulberry leaves. *Bulletin Natural Institute Sericultural and Entomological Science*. 1: 27-44.
- Ye, Z. 2002. Factors influencing mulberry leaf yield. En: Sánchez, M. D. (ed.). *Mulberry for Animal Production*. FAO Animal Production and Health Paper 147. Rome, pp. 124-125.
- Yonkang, H. 2002. Mulberry Cultivation and Utilization in China. En: Sánchez, M. D. (ed.). *Mulberry for Animal Production*. FAO Animal Production and Health Paper 147. Rome, pp. 11-43.
- Yungen, M. 2003. Conservation status of mulberry genetic resources in China. En: Sohn, K.W. (ed.). *Conservation status of sericulture germplasm resources in the world. I. Conservation status of mulberry (*Morus* spp.) genetic resources in the world*. From papers contributed to expert consultation on promotion of global exchange of sericulture germplasm. FAO. Bangkok, Tailand. pp. 47-78.

- Zaman, A.; R. Islam, O.I. Joarder, A. Ahad y A.C. Barman. 1992. Clonal propagation through *in vitro* shoot proliferation on nodal explants of seven mulberry genotypes. *Plant Tissue Culture*. 2: 71-74.
- Zepeda, J. 1991. El árbol de oro. Los mil usos de la morera. *Medio Ambiente*. Perú. 47: 28-29.
- Zebrowska, J.I.; J. Czernas, J. Gawronski y J.A. Hortynski. 2003. Suitability of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) microplants to the field cultivation. *Food, Agriculture and Environment*. 1(3-4): 190-193.
- Zhao, Y. 2008. The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*. 11: 16-22.
- Zhao, W.G.; X. Miao, S. Xia, Y. Pan y Y. Huang. 2005a. Isolation and characterization of microsatellite loci from mulberry, *Morus alba* L. *Plant Science*. 168: 519-525.
- Zhao, W.G.; Y. Pan, Z.J.S. Zhang, X. Miao y Y. Huang. 2005b. Phylogeny of the genus *Morus* (Urticales: *Moraceae*) inferred from ITS and trnL-F sequences. *African Journal of Biotechnology*. 4(6): 563-569.
- Zhao, W.G.; Z.H. Zhou, X.X. Miao, S.B. Wang, L. Zhang, Y.L. Pan y Y.P. Huang, 2006. Genetic relatedness among cultivated and wild mulberry (*Moraceae: Morus*) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis in China. *Canadian Journal of Plant Science*. 86: 251-257.
- Zhao, W.G.; Ch. Tingting, Y. Yonghua y P. Yile. 2007a. A preliminary analysis of asexual genetic variability in mulberry as revealed by ISSR markers. *International Journal of Agriculture and Biology*. 9(6): 928-930.
- Zhao, W.G.; Y. Wang, T. Cheng, G. Jia, W. Wang, J. Qi, Y. Pang, S. Wang, Z. Li, Y. Huang, Y. Pan y T.H. Yang. 2007b. Genetic structure of mulberry from different ecotypes revealed by ISSRs in China: An implications for conservation of local mulberry varieties. *Scientia Horticulturae*. 115: 47-55.
- Zhouqi, L.; K. Shiqiang y X. Yangfu, 2004. Somaclonal variation in tissue culture research of forest tree. *Journal of Northwest for University*. 19: 77-81
- Ziv, M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. En: *Micropropagation: technology and application*. Debergh, P.C. y R.H. Zimmermann (eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp. 45-69.
- Zucchi, M.I.; H. Arizono, V.A. Morais, M.H. Pelegrinelli y M.L. Carneiro. 2002. Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem cultures. *Genetics and Molecular Biology*. 25(1): 91-96.

ANEXOS

Anexo 1. Caracterización físico-química de los sustratos organo-minerales empleados en la aclimatización de las plantas *

	Sustrato		
	Humus de lombriz 100%	Humus de lombriz 50% + zeolita 50%	Humus de lombriz 85% + zeolita 15%
Capacidad absorción de agua (%)	64,2	55,44	60,82
Densidad aparente (g.cm ³)	0,5	0,44	0,49
pH	7,4	7,4	7,4
Conductividad eléctrica (Ms.cm ⁻¹)	2,6	2,45	2,51
N (%)	2,38	2,81	2,9
P (%)	1,8	1,05	1,65
K (%)	0,45	0,22	0,39
Ca (%)	0,2	0,06	0,09
Mg (%)	2,11	2,11	2,11
Carbono (%)	22,59	20,55	21,85
Materia orgánica (%)	38,95	36,25	37,15
Relación C/N	9,49	7,31	7,53

* Laboratorio Provincial de Suelos, Santa Clara, Villa Clara.

Anexo 2. Protocolo para la extracción y purificación del ADN de morera

1. Recolectar 10 g de tejido foliar joven y fresco en papel aluminio y almacenarlo en nitrógeno líquido a -80°C durante el traslado al laboratorio.
2. Pulverizar el tejido con nitrógeno líquido.
3. A una muestra de 0,5 g de tejido, agregar 5,0 ml del buffer Clean Up (100 mM Tris-HCl, 0,35 M sorbitol, 10% PEG 6000 y 2,0% 2 β -mercaptoetanol).
4. Centrifugar (Centrifuge 5810 R Eppendorf) a 8000 g durante 10 minutos.
5. Añadir 5 ml de la solución tampón de extracción que contiene: 2,0% CTAB, 1,4 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA, pH 8,0; 2,0% PVP-3600 y 2,0% β -mercaptoetanol que fueron añadidos al momento de ser utilizados.
6. Incubar a 60°C durante 30 minutos. Mezclar el tubo delicadamente cada cinco minutos.
7. Enfriar a temperatura ambiente.
8. Realizar extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)
9. Centrifugar a 12000 g durante 20 minutos.

10. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y añadir 10 µl RNAsa.
11. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
12. Enfriar a temperatura ambiente
13. Realizar una segunda extracción con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)
14. Centrifugar a 12000 g durante 20 minutos.
15. Añadir 5,0 ml de isopropanol frío. Agitar suavemente.
16. Precipitar la muestra a -20°C durante tres horas.
17. Centrifugar a 12000 g por cinco minutos.
18. Desechar el líquido teniendo cuidado de no perturbar el botón de ADN que se forma al fondo del tubo.
19. Disolver el pellet de ADN en 1,0 ml de la solución tampón TE (10 mM Tris-HCl y 1,0 mM EDTA pH=8,0).
20. Agregar 2,0 ml de etanol absoluto frío. Mover suavemente para ver la aparición del precipitado de ADN.
21. Incubar a -20°C durante una hora
22. Centrifugar a 12000 g durante cinco minutos. Desechar sobrenadante.
23. Lavar con etanol 75% frío
24. Centrifugar a 12000 g durante cinco minutos. Desechar sobrenadante.
25. Centrifugar a 12000 g por 30 segundos. Remover sobrenadante con pipeta.
26. Dejar secar el botón de ADN a temperatura ambiente en campana de extracción de gases (IKEM 1005) para eliminar el resto del solvente.
28. Resuspender en agua bidestilada estéril (100 µl).
29. Conservar a -20°C.