

## Propagación *in vitro* de *Morus alba* L. en medio de cultivo semisólido

Enrique Salas Barbosa<sup>1,2</sup>, Daniel Agramonte<sup>2</sup>, Raúl Barbón<sup>2</sup>, Felipe Jiménez<sup>2</sup>, Raúl Collado<sup>2</sup>, Martha Pérez<sup>2</sup>, Odalys Gutiérrez<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Colegio de Postgraduados. Campus Tabasco. km 3 carretera Cárdenas-Huimanguillo. C.P. 86 500. H. Cárdenas, Tabasco. México. e. mail: salas2001mx@yahoo.com.mx, salasj@colpos.mx

<sup>2</sup> Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. CP 54 830. Villa Clara. Santa Clara, Cuba.

### RESUMEN

Se utilizaron yemas apicales como explantes con el objetivo de propagar *in vitro* la morera en medio de cultivo MS semisólido suplementado con 6-BAP y KIN en su establecimiento y con diferentes combinaciones de 6-BAP con ANA en la multiplicación. Las plantas *in vitro* fueron evaluadas en fase de aclimatización. Es necesario suplementar el medio de cultivo MS basal con 0.5 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP para inducir la brotación, y multiplicar la morera vía segmentos nodales adicionando al medio de cultivo 0.5 mg.l<sup>-1</sup> 6-BAP y 0.5 mg.l<sup>-1</sup> ANA. Se observó un 95% de supervivencia, 30.2 cm de altura, 9.8 hojas y 2.02 g.planta<sup>-1</sup> de masa seca en la fase de aclimatización. Se logró la propagación *in vitro* de la morera como una alternativa para la producción de material vegetal.

Palabras clave: aclimatización, brotación, establecimiento, explante, yemas apicales

### ABSTRACT

Apical buds as explants were used with the objective to propagate *in vitro* mulberry plants in semisolid MS culture medium supplemented with 6-BAP and KIN in their establishment and, with different combinations of 6-BAP with ANA in the multiplication phase. *In vitro* plants were evaluated during the acclimatization phase. It is necessary to supplement the basal MS culture media with 0.5 mg.l<sup>-1</sup> of 6-BAP to induce the sprouting and, 0.5 mg.l<sup>-1</sup> of 6-BAP and 0.5 mg.l<sup>-1</sup> of ANA to multiply the mulberry by nodal segments. In the acclimatization phase a 95% of survival, 30.2 cm of height, 9.8 leaves and 2.02 g.plant<sup>-1</sup> of dry mass was observed. *In vitro* propagation of mulberry was achieved as an alternative for plants production.

Key words: acclimatization, apical buds, establishment, explant, shooting

### INTRODUCCIÓN

El cultivo de la morera se inició hace 5 000 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 cuando se inició la investigación y utilización como alimento animal en América Latina y el Caribe, debido a su alto rendimiento de biomasa, palatabilidad y elevado valor nutritivo, principalmente, esto asociado siempre a las Instituciones de investigación (Datta, 2002; Machii *et al.*, 2002; Sánchez, 2002; Yongkang, 2002).

Por otro lado, se han desarrollado estudios en esta especie como alimento animal en Japón, India, República de Tanzania, Kenia, Costa Rica, Colombia, México, El Salvador, Guatemala, Brasil y Cuba. En este último, es donde se ha investigado la morera más activamente en aspectos agronómicos, diversas modalidades de cosecha, conservación de forraje y experimentos con animales (González y Milera, 2000; Martín *et al.*, 2002; Sánchez, 2002).

Las técnicas convencionales para la propagación de morera incluyen las estacas y semilla, dependiendo del cultivar; sin embargo, existen ciertas limitantes como baja tasa de supervivencia, dificultad de enraizamiento y baja tasa de multiplicación, que las hacen no viables técnica y económicamente para la propagación de esta especie vegetal (Bhau y Wakhlu, 2001; Lu 2002).

De lo anterior se desprende la importancia de establecer un método de propagación más eficiente en esta especie vegetal de gran interés para la alimentación animal, por lo cual el objetivo del presente trabajo fue aplicar el cultivo *in vitro* para la propagación de *Morus alba* L. variedad Criolla.

### MATERIALES Y METODOS

Se tomaron yemas apicales como explantes iniciales con una longitud promedio de 4.0 cm, de rebrotes de tres meses procedentes de plantas de morera con cuatro años de establecidas en campo, los cuales se lavaron con detergente y agua destilada durante 10 minutos, y se

sometieron a desinfección utilizando etanol al 70% durante un minuto e hipoclorito de sodio al 1% por 15 minutos y finalmente se enjuagaron cuatro veces con agua desionizada estéril.

La esterilización de los medios de cultivo se realizó en autoclave vertical a 121°C, 1.2 kg cm<sup>-2</sup> de presión y un tiempo de 20 minutos. El pH fue ajustado a 5.8 con soluciones de NaOH (0.1N) y HCl (0.1N) previo a la esterilización.

Las yemas apicales desinfectadas y reducidas a un tamaño de 1.5 cm, fueron establecidas en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 100 mg.l<sup>-1</sup> de mio-inositol, 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa, 6 bencilaminopurina (6-BAP) (0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 mg.l<sup>-1</sup>) y kinetina (0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 mg.l<sup>-1</sup>).

Se emplearon tubos de ensayo, en los cuales se vertieron 10 ml de medio de cultivo con un explante en cada uno. Se utilizaron 30 tubos por tratamiento y el experimento se repitió dos veces. Se evaluó a los 28 días la longitud de los brotes (cm) y el número de brotes por explante.

En la fase de multiplicación se empleó el 6-BAP (0.25, 0.5 y 1.0 mg.l<sup>-1</sup>) solo o combinado con ácido naftalenacético (ANA) (0.25, 0.5 y 1.0 mg.l<sup>-1</sup>) y un tratamiento sin reguladores del crecimiento como control. Los explantes empleados fueron segmentos nodales de 2 a 3 cm de longitud con una yema axilar presente y una hoja de las plantas *in vitro* procedentes de la fase de establecimiento. La evaluación se realizó a los 28 días. El experimento se repitió tres veces y se determinó la longitud de los brotes, el número de brotes por explante y el coeficiente de multiplicación.

Los experimentos de establecimiento y multiplicación se realizaron en condiciones de luz solar indirecta, una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 50 a 62.5 mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> y una temperatura de 27±1°C.

Para la aclimatización de las plantas regeneradas se eliminaron los restos de medio de cultivo con agua corriente. Se emplearon plantas de 7 cm de altura promedio. Las plantas fueron establecidas en contenedores de poliuretano con 70 orificios en condiciones de casa de cultivo con regulación de la intensidad luminosa a un 70% la primera semana mediante una malla plástica.

Se evaluaron tres variantes de sustrato: humus de lombriz al 100%, humus de lombriz 50% más 50% de zeolita y 85% humus de lombriz más 15% de zeolita. A los 45 días se determinó la supervivencia (%), altura de la planta (cm), número de hojas y masa seca por planta (g). Se emplearon cuatro

repeticiones con 100 plantas cada una y para la masa seca 20 plantas completas sin raíces.

Los datos de la variable número de brotes por explante fueron transformados previo a su análisis con vx y los expresados en porcentaje mediante la transformación de arco seno (vx). Se analizaron estadísticamente mediante un ANOVA multifactorial con el paquete computacional SPSS versión 13.0 y la comparación múltiple de medias de Tukey estableciendo el nivel de significancia en 5%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Fase de establecimiento*

La interacción entre el tipo de citoquinina y la concentración influyó sobre las variables evaluadas. En todos los casos se observaron valores superiores en los tratamientos donde se empleó el 6-BAP en relación con aquellos en los cuales se utilizó kinetina, para una misma concentración. Los máximos valores en las dos variables con diferencias significativas con el resto de los tratamientos se lograron en el tratamiento con 0.5 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP (Tabla 1).

Los resultados mostraron que con pequeñas concentraciones de 6-BAP se logró un adecuado balance endógeno de citoquininas y auxinas que permiten mejorar el crecimiento de los explantes en esta fase, a su vez, las concentraciones más altas de esta citoquinina fueron inhibitorias.

De acuerdo con Orellana (1998), Delgado (2000) y Olmos *et al.* (2004), la citoquinina que más se ha utilizado en la propagación de especies leñosas es el 6-BAP, debido a su mayor efectividad en la regeneración de brotes de estas especies, lo cual lo corroboraron Habib *et al.* (2003), Hassanein *et al.* (2003) y los resultados obtenidos en este experimento en algunas especies del género *Morus* al comparar el 6-BAP respecto a la kinetina.

En eucalipto, Delgado (2000) indicó que los valores superiores a 0.3 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP fueron perjudiciales para el buen desarrollo de los brotes pues disminuyó considerablemente el coeficiente de multiplicación por los bajos índices de crecimiento que experimentan los explantes.

Otros autores como Islam *et al.* (1993) y Lu (2002) señalaron los mejores valores en el establecimiento de morera con el uso de 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP, pero sin diferencias significativas respecto al empleo de 0.5 y 2.0 mg.l<sup>-1</sup> de esta citoquinina y establecen que 0.5 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP es suficiente para inducir crecimiento en las yemas apicales.

Tabla 1. Influencia del 6-BAP y la kinetina en el establecimiento *in vitro* de yemas apicales de *Morus alba* L. variedad Criolla.

Citoquinina	Concentración (mg.l <sup>-1</sup> )	No. brotes por explante		Longitud de los brotes (cm)
		VT	VR	
Kin	0.25	1.149 de	1.32	2.64 de
	0.50	1.217 d	1.48	2.92 cd
	1.00	1.225 d	1.50	3.01 c
	2.00	1.095 e	1.20	2.43 ef
6-BAP	0.25	1.536 bc	2.36	4.10 b
	0.50	1.772 a	3.14	4.99 a
	1.00	1.640 b	2.69	4.14 b
	2.00	1.493 c	2.23	4.01 b
	Control	1.010 e	1.02	2.17 f
	±EE	0.04		0.10

Medias con letras distintas en la misma columna difieren para  $p < 0.05$  de acuerdo con Tukey  
VT. Valores transformados mediante vx. VR. Valores reales. EE. Error estándar

Por otro lado, Chitra y Padmaja (1999) indicaron los mejores resultados al utilizar 2.0 mg.l<sup>-1</sup> 6-BAP, al comparar el empleo de 6-BAP y kinetina. Habib *et al.* (2003) señalaron el mismo comportamiento, pero los máximos valores los obtuvieron con 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de esta citoquinina. Esta diferencia en la respuesta a diversas concentraciones de 6-BAP pudiera deberse principalmente al efecto del genotipo, ya que en el primer caso se realizó en *Morus indica* L. cultivar M-5 y en el segundo en *Morus alba* L. variedad Kokuso-27, lo cual corrobora lo establecido por Olmos *et al.* (2004), quienes indican 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 referidas en las concentraciones por algunos autores, en la mayoría de los casos el uso del 6-BAP fue necesario para incrementar los resultados en el número de brotes por explante y la longitud de los brotes en esta fase.

#### Fase de multiplicación

Se observaron diferencias significativas en la interacción entre el tipo y la concentración de los reguladores del crecimiento para las variables longitud de los brotes, número de brotes por explante y coeficiente de multiplicación.

Los mejores resultados estuvieron asociados al uso de la concentración 0.5 mg.l<sup>-1</sup> 6-BAP en las variables evaluadas y el mejor tratamiento observado fue al combinar 0.5 mg.l<sup>-1</sup> de 6-BAP con 0.5 mg.l<sup>-1</sup> de ANA con diferencia significativa respecto a los demás tratamientos incluyendo al control (Tabla 2).

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, ya que de acuerdo con los

resultados obtenidos en este experimento sería necesario conocer las concentraciones endógenas de estos reguladores que posee la morera así como sus mecanismos de regulación.

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 balance interno en los tejidos que promueven el crecimiento y diferenciación de los brotes, así como estimule el incremento de las tasas de multiplicación. Esto se debe a que, en leñosas, las auxinas promueven la actividad del cambium en el tejido vascular, estimulan la división celular, se expanden las yemas por el movimiento de las auxinas hacia los tallos y se forma tejido vascular secundario, que da como resultado la brotación de las yemas axilares (Rayen *et al.*, 1999).

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 *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2004; Uribe y Cifuentes, 2004; Martínez *et al.*, 2005).

Autores como Jain y Datta (1992), Chitra y Padmaja (2002) y Habib *et al.* (2003) indicaron que los mejores resultados en la multiplicación *in vitro* de la morera se obtuvieron al utilizar el medio de cultivo MS suplementado únicamente con 6-BAP. Sin embargo, Jain *et al.* (1996), Sahoo *et al.* (1997) y Anis *et al.* (2003) establecieron que es necesario combinar el 6-BAP con ANA para hacer más eficiente el proceso de multiplicación de esta especie, ya que con ello se obtienen mejores resultados.

En otras especies leñosas también fue evidente el mejor comportamiento de los explantes en la fase de multiplicación al combinar el 6-BAP con ANA al medio de cultivo MS como lo señalan Trocones (2000) en *Hibiscus elatus* Sw. y Delgado (2000) en *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la fase de multiplicación, en la cual las plantas tuvieron desarrollo radicular (Figura 1), la fase de enraizamiento no fue necesaria, por lo que las plantas *in vitro* se llevaron directamente a la fase de aclimatización. De esta forma se hace más eficiente la propagación *in vitro* de esta variedad de morera, debido a que se elimina la fase de

enraizamiento que es la más voluminosa dentro del proceso de propagación.

El tipo de sustrato empleado tuvo efecto significativo sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas *in vitro* en condiciones de casa de cultivo. El tratamiento donde se obtuvieron los mejores resultados fue al utilizar el sustrato con 85% de humus de lombriz más 15% de zeolita para todas las variables evaluadas, lo cual indicó que las plantas manifestaron un mejor comportamiento en la fase de aclimatización al utilizar un sustrato rico en nutrientes y con buenas características físicas como lo fue el humus de lombriz mezclado con zeolita (Tabla 3).

Tabla 2. Influencia del 6-BAP solo o combinado con ANA sobre la proliferación de brotes de *Morus alba* variedad Criolla en la fase de multiplicación.

6-BAP (mg.l <sup>-1</sup> )	ANA	Longitud de los brotes ( cm )	No. brotes.explante <sup>-1</sup>		Coeficiente de multiplicación
			VT	VR	
0.0	0.0	1.03 i	1.00 i	1.00	1.32 j
0.25	0.0	3.18 h	1.31 h	1.71	2.67 i
0.50	0.0	3.70 g	1.47 f	2.15	3.10 gh
1.00	0.0	3.13 h	1.37 g	1.88	2.70 hi
0.25	0.25	4.25 ef	1.73 d	3.00	4.50 e
0.25	0.50	4.00 fg	1.58 e	2.50	3.75 f
0.25	1.00	3.85 g	1.50 f	2.25	3.38 fg
0.50	0.25	6.00 b	1.98 b	3.91	6.00 c
0.50	0.50	7.13 a	2.31 a	5.33	8.00 a
0.50	1.00	5.70 b	2.00 b	4.00	6.63 b
1.00	0.25	5.11 c	1.85 c	3.43	5.25 d
1.00	0.50	4.75 d	1.73 d	3.00	4.50 e
1.00	1.00	5.03 cd	1.69 d	2.85	4.28 e
	±EE	0.12	0.022		0.14

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.

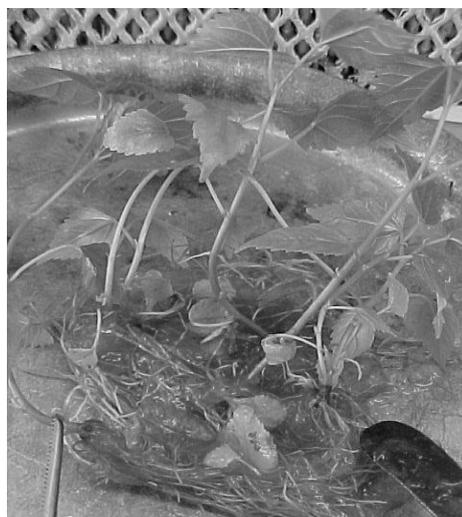


Figura 1. Desarrollo radicular de plantas de *Morus alba* L. variedad Criolla durante la fase de multiplicación *in vitro*.

Tabla 3. Influencia del tipo de sustrato sobre el desarrollo de plantas *in vitro* de *Morera* en fase de aclimatización.

Sustrato	Supervivencia (%)		Longitud de la planta(cm)	No. de hojas	Masa seca (g.planta <sup>-1</sup> )
	VT	VR			
100% humus de lombriz	1.284 c	92.0	26.5 c	7.0 c	1.27 c
50% humus de lombriz + 50% zeolita	1.303 b	93.0	28.7 b	8.2 b	1.67 b
85% humus de lombriz + 15% zeolita	1.345 a	95.0	30.2 a	9.8 a	2.02 a
±EE	0.008		0.35	0.08	0.03

Medias con letra distinta en la misma columna difieren para  $p < 0.05$  de acuerdo con Tukey VT. Valores transformados mediante arcoseno ( $\sqrt{x}$ ). VR. Valores reales. EE. Error estándar

En este sentido Agramonte (2000), Jiménez (2001) y Díaz *et al.* (2004), indicaron que el humus de lombriz como componente del sustrato tiene algunas características necesarias para hacer más eficiente el proceso de aclimatización tales como: sirve de sostén a la planta, permite el 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, la composición química de este sustrato permite un crecimiento rápido y vigoroso de las plantas *in vitro* en esta fase, dado que posee los nutrientes esenciales para la planta como nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro, cobre, zinc y molibdeno, lo cual es muy favorable para realizar el posterior trasplante a condiciones de campo.

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 *et al.*, 1998; Agramonte, 2000; Jiménez, 2001).

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 *et al.* (1997) y Bhau y Waklhu, (2001) señalaron valores inferiores (70-75%) 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. Estos bajos índices pueden 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 superior a 7.0. Al respecto,

Palhares *et al.* (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 de las plantas *in vitro* para el buen desarrollo de las mismas durante la fase de aclimatización (Singha *et al.*, 1995; Dottin, 2000; Gnanam, 2004). 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. Por lo cual, se seleccionaron las plantas *in vitro* con la altura promedio adecuada en la fase de multiplicación para la evaluación en la fase de aclimatización.

En la literatura consultada se encontraron pocos trabajos relacionados con la aclimatización de plantas *in vitro* de *Morus*, por lo tanto para la discusión fue necesario considerar también los resultados en otras especies leñosas.

En *Eucalyptus grandis* Hill ex Maden (Delgado, 2000; Agramonte *et al.*, 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 *et al.* (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 longitud de la planta (4.3 cm) a los 60 días de aclimatización con el empleo de humus de lombriz y tierra en una relación 1:1 de cada uno de ellos. Mientras que Silva *et al.* (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 *et al.* (2003) observaron una menor longitud de las ramas y menor número de hojas (27.2 cm y 2.5

respectivamente) a los 49 días y plantadas en canteros con cachaza y suelo respecto a los observados en este experimento.

En otras especies vegetales no leñosas derivadas del cultivo *in vitro* como *Saccharum* spp., Díaz *et al.* (2004) no observaron diferencias significativas con el empleo de humus de lombriz combinado con tierra a diferentes porcentajes de cada uno a los 60 días de aclimatación en la variable longitud de la planta.

La mayor cantidad de masa seca obtenida en el sustrato con 85% humus de lombriz y 15% zeolita estuvo relacionada principalmente con una mayor longitud de los tallos y número de hojas con diferencias significativas en relación a los demás sustratos.

En algunas especies leñosas como *Sinningia Speciosa* Lood. Hiern. y *Eucalyptus urograndis*, Bortolotti *et al.* (2003) y Silva *et al.* (2005) indicaron los mejores resultados en las variables masa seca en plantas derivadas de 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 aclimatación debido a la composición de la pared celular y del protoplasma, como lo establecieron también Castro y González (2002).

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 aclimatación, se logran plantas de *Morus alba* L. variedad Criolla de alta calidad en términos de una mayor producción de masa seca y longitud de los brotes como material de plantación para la fase de campo.

## CONCLUSIONES

Se logró la propagación *in vitro* de la morera como una alternativa para la producción de material vegetal. En el establecimiento de yemas apicales de morera es necesaria la suplementación con 0.5 mg.l<sup>-1</sup> 6-BAP al medio de cultivo basal para inducir la brotación; sin embargo, para la multiplicación de las yemas axilares se debe adicionar 0.5 mg.l<sup>-1</sup> 6-BAP y 0.5 mg.l<sup>-1</sup> de ANA al medio de cultivo basal. El mejor sustrato para la aclimatación de las plantas *in vitro* de morera fue el compuesto por 85% humus de lombriz y 15% zeolita.

## REFERENCIAS

Agramonte, D (2000) Métodos biotecnológicos para la producción de semilla original de papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Cuba. 96 p.

Agramonte, D, F Jiménez, M A Dita (1998) Aclimatación. En: J N Pérez (Ed.) Propagación y Mejora Genética de Plantas por

Biotecnología, pp. 193-206. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara

Agramonte, PD, 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

Anis, M, M Faisal y SK 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

Bhau, BS, AK Wakhlu (2001) Effect of genotype, explant type and growth regulators on organogénesis in *Morus alba* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 66: 25-29

Bortolotti, SA, M Pasqual, AL Rezende y L Ferreira (2003) BAP e sustratos na aclimatacao de plântulas de gloxinia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.) provenientes de cultura de tecidos. Lavras. 27(2): 255-260

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

Chitra, VDS y G Padmaja (1999) Clonal propagation of mulberry (*Morus indica* L.) variedad M-5 through *in vitro* culture of nodal explants. Scientia Horticulturae 80: 289-298

Chitra, VDS y G Padmaja (2002) Seasonal influence on axillary bud sprouting and micropropagation of elite cultivars of mulberry. Scientia Horticulturae 92: 55-68

Datta, RK (2002) Mulberry cultivation and utilization in India. En: Sánchez, MD (ed.) Mulberry for Animal Production. FAO Animal Production and Health Paper 147, pp. 45-62. Roma

Delgado, FLA (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. Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV. 53 p.

Díaz, LP, LF Medina, J Latife, PA Dignonelli y SB Sosa (2004) Aclimatación de plantas micropropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz. RIA. 33(2): 115-128

González, E y M Milera (2000) Mulberry in livestock feeding systems in Cuba: forage quality and goat growth. En: FAO. Mulberry for animal production. Electronic conference. <http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGA/AGAP/FRG/MULBERRY/home.htm>

Dottin, MP (2000) Propagación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schoff) Tesis presentada en opción al grado científico de doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV. 119 p.

Gnaman, R (2004) Micropropagation of mulberry using shoot tip (or) nodal segments. Proceedings of Indian Academy. <http://nau.ac.in/cpps/productive/sericulture/0105.htm>

Habib, A, MR Ali, MN Amin, MM Arman (2003) Clonal propagation of white mulberry (*Morus alba* L.) using *in vitro* technique. Journal of Biotechnological Sciences. 3(12): 1181-1187

Hassanein, AM, AA Galal y MM 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

Islam, R, A Zaman, Al Joarder, AC Barman (1993) *In vitro* propagation as an aid for cloning of *Morus laevigata* Wall. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 33: 339-341

Jain, AK y Datta RK (1992) Shoot organogenesis and plant regeneration in mulberry (*Morus bombycis* Koidz.): Factors influencing morphogenetic potential in callus cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29: 43-50

- Jain, AK, A Sarkar y RK 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
- Lu, M Ch (2002) Micropropagation of *Morus latifolia* Poilet using axillary buds from mature trees. *Scientia Horticulturae* 96: 329-341
- 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
- Machii, H, A Koyama y H Yamanouchi (2002) Mulberry Breeding, Cultivation and utilization in Japan. En: Sánchez, MD (ed.) Mulberry for Animal Production. FAO Animal Production and Health Paper 14, pp. 63-71. Roma
- Maciel, SD, JA Voltoni y EL Pedrotti (2002) Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta-enxerto de maceira Marubakaido micropropagado. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jabotical 24(2): 289-292
- Martínez, R, H Azpiroz, JL Rodríguez, V Cetina, M Gutiérrez y J Sahún (2005) Micropropagación clonal *in vitro* en *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus urophylla*. *Ra Ximhai*. 1(1): 111-130
- Murashige, T y FS Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 437-497
- Olmos, S, G Lusiani y E Galdeano (2004) Micropropagación. En: V Echenique, C Rubinstein y L Mroginski (eds.). Biotecnología y mejoramiento vegetal. Parte V: Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Editorial INTA, pp. 163-172. Buenos Aires
- Orellana, P (1998) Propagación vía organogénesis. En: Pérez, JN (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. pp. 151-178. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara.
- Pahlares, GA, R Rodríguez, M Cid, D Pina y JL González (2004) Efecto de un análogo de brasinosteroides (MH5) en la propagación de *Eucalyptus urograndis* en biorreactores de inmersión temporal. *Cultivos Tropicales* 25(1): 39-44
- Pattnaik, S y PK 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
- Rayen, PH, RF Evert y SE Eichhorn (1999) Biology of plants. Sixth edition. W.H. Freeman and Company Worth Publishers.
- Rodríguez, R, M, Daquinta, J Capote, D Pina, Y Lezcano y JL González (2003) Nuevos aportes a la micropropagación de *Swietenia macrophylla* x *Swietenia mahogany* (Caoba híbrida) y *Cedrela odorata* (cedro). *Cultivos Tropicales* 24: 23-27
- Sahoo, Y, SK Pattnaik y PK Chand (1997) Plant regeneration from callus cultures of *Morus indica* L. derived from seedlings and mature plants. *Scientia Horticulturae* 69: 85-98
- Sánchez, MD (2002) Mulberry: an exceptional forage available almost worldwide. En: Sánchez, MD (ed.). Mulberry for Animal Production. Paper 147. FAO Animal Production and Health, pp. 301-313. Roma
- Sánchez, M, D Rios, 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
- Silva, JD Giang y M Tanaka (2005) Novel micropropagation system for *Eucalyptus urograndis*. *Bragantia* 64(3): 349-359
- Singha, S, EC Townsend y GH 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
- Trocones, AG (2000) Micropropagación de *Hibiscus elatus* Sw. a partir de árboles seleccionados. Tesis presentada en opción al título académico de Magister Scientiae en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. 66 p.
- Uribe, M y L Cifuentes (2004) Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en la propagación de *Legrandia concinna*. *Bosque* 25(1): 129-135
- Yonkang, H (2002) Mulberry Cultivation and Utilization in China. En: Sánchez, MD (ed.) Mulberry for Animal Production. FAO Animal Production and Health Paper 147, pp. 11-43. Roma