

## Propagación de plantas de *Morus alba* var. Criolla con el uso de sistemas de inmersión temporal

J. E. Salas<sup>1,2</sup>, D. Agramonte<sup>1</sup>, F. Jiménez-Terry<sup>1\*</sup>, M. Pérez<sup>1</sup>, R. Collado<sup>1</sup>, R. Barbón<sup>1</sup>, M. La O<sup>1</sup>, M. De Feria<sup>1</sup>, M. Chávez<sup>1</sup> \*Autor para correspondencia

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: felipe@ibp.co.cu

<sup>2</sup>Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo 56 230, Estado de México. salasj@colpos.mx; salas2001mx@yahoo.com.mx

### RESUMEN

La morera (*Morus alba* L.) es una planta forrajera de gran importancia económica. El presente trabajo se realizó con la finalidad de propagar *in vitro* la variedad 'Criolla' vía organogénesis con el uso de Sistemas de Inmersión Temporal. Se definieron los medios y condiciones de cultivo para los sistemas de inmersión temporal y los resultados demostraron que fue posible obtener un coeficiente de multiplicación elevado de 15.5. 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 cuatro inmersiones por día. Las plantas cultivadas *in vitro* mediante sistemas de inmersión temporal se establecieron en la fase de aclimatización en un sustrato compuesto por 85% humus de lombriz y 15% de zeolita y fueron superiores en las variables morfológicas evaluadas respecto a las propagadas por el método convencional de estacas.

Palabras clave: coeficiente de multiplicación, plantas *in vitro*, variaciones morfológicas

### ABSTRACT

The mulberry (*Morus alba* L.) it is a forage plant of great economic importance. The present work was carried out with the purpose of to *in vitro* propagate the variety 'Criolla' via organogenesis with the use of Temporary Immersion Systems. It were defined the media and culture conditions for the temporary immersion systems. The results demonstrated that it was possible to obtain a high multiplication coefficient of 15.5. The immersion frequency had a significant influence on the evaluated variables. Maximum values were observed in the number of buds, the longitude of the buds and the multiplication coefficient with four immersions per day. The plants *in vitro* cultivated in temporary immersion systems were established in the acclimatization phase in a substrate compound for 85% worm humus and 15% zeolita. It were superior in the morphological variables evaluated regarding those propagated by the conventional method of stakes.

Key words: multiplication coefficient, *in vitro* plants, morphologic variations

### INTRODUCCIÓN

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 *et al.*, 2006).

En México, existe una demanda potencial de alrededor de ocho millones de posturas (si se considera una densidad de plantación de 1.0x0.5m de distancia entre surcos y plantas (Sánchez, 2006; García *et al.*, 2009).

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; Pelicano *et al.*, 2007). 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 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; y que el material de plantación (tallos) es también utilizado para la alimentación animal, lo cual reduce aún más su disponibilidad (Balakrishnan *et al.*, 2009).

Debido a la problemática que presenta la propagación de la morera por estacas, la propagación *in vitro* es una alternativa para la producción de grandes cantidades de plantas homogéneas en un período de tiempo relativamente corto.

Existen resultados en la propagación *in vitro* de *Morus alba* L. mediante organogénesis en medios de cultivo semisólido (Salas *et al.*, 2005) y sin embargo no se encontraron resultados de investigaciones utilizando los sistemas de inmersión temporal en la literatura consultada.

Considerando lo expuesto anteriormente, se estableció el siguiente objetivo de propagar *Morus alba* L. variedad Criolla con el uso de Sistemas de Inmersión Temporal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal*

Se utilizaron segmentos nodales procedentes de plantas *in vitro* de *Morus alba* L. variedad Criolla del segundo subcultivo de multiplicación según la metodología propuesta por Salas *et al.* (2005).

### *Medios de cultivo*

El medio de cultivo que se empleó estuvo compuesto por las sales inorgánicas propuestas por Murashige y Skoog (1962), 100 mg l<sup>-1</sup> de mio-inositol, 1.0 mg l<sup>-1</sup> de tiamina y 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, el cual será referido posteriormente como MSM. La esterilización de los medios de cultivo y frascos, se realizó en autoclaves a 121°C y 1.2 kg cm<sup>-2</sup> durante 40 minutos, mientras que el pH se ajustó a 5.8 previo a la esterilización, con soluciones de NaOH (0.1N) y HCl (0.1N).

### *Condiciones de crecimiento in vitro*

Los explantes se colocaron en cámaras en crecimiento bajo condiciones de luz solar indirecta.

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  $\mu$ m) para garantizar la esterilidad del aire. La presión del aire proveniente del compresor, fue regulada con un manómetro.

### *Procesamiento estadístico*

Los datos de las variables 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. 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. La prueba de comparación de medias de Tukey y se estableció el nivel de significancia de todas las pruebas en 5%. En cada experimento se detallan los análisis estadísticos específicos realizados. Se utilizó el paquete computacional SPSS versión 16.0 para Windows (SPSS, 2008).

## Multiplicación de morera en Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)

De acuerdo con 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.

### 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  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de ácido naftalenacético (ANA). Se emplearon diez segmentos nodales por SIT 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 cuantificó el número de brotes por explante, se midió 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.

### 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 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 veces 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  $60^\circ\text{C}$  durante 72 horas hasta peso constante. Los datos fueron procesados mediante un análisis de varianza de clasificación simple.

### Aclimatización

El objetivo de este experimento fue evaluar diferentes tipos de sustratos para la aclimatización de las plantas *in vitro* propagadas en los SIT y en medio de cultivo semisólido. 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 anteriormente.

Plantas *in vitro* procedentes del cuarto subcultivo de la fase de multiplicación con una longitud de 8.0 cm según la metodología propuesta por Salas *et al.* (2005) se utilizaron como control (PSS) y las plantas *in vitro* obtenidas en SIT (PSIT) fueron plantadas en contenedores de polietileno de 70 alvéolos con una capacidad de  $120 \text{ cm}^3$  de sustrato cada uno bajo condiciones de casa de cultivo. Fueron retiradas de los frascos cuidadosamente; sus raíces se lavaron con agua corriente para eliminar los restos de medio de cultivo y trasladadas a la casa de cultivo en bandejas de plástico con una fina película de agua para evitar la deshidratación.

Se evaluaron tres variantes de sustrato de acuerdo con los resultados obtenidos en otros estudios con especies leñosas (Delgado, 2000; Trocones, 2000; Agramonte *et al.*, 2001). Los tratamientos evaluados se muestran en la tabla 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). La composición de los sustratos formulados se analizó en el laboratorio provincial de suelos de Villa Clara (Tabla 2).

Tabla 1. 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	Medio de cultivo semisólido	50% humus de lombriz y 50% zeolita
4	Sistemas de inmersión temporal	50% humus de lombriz y 50% zeolita
5	Medio de cultivo semisólido	85% humus de lombriz y 15% zeolita
6	Sistemas de inmersión temporal	85% humus de lombriz y 15% zeolita

Tabla 2. Caracterización físico-química de los sustratos organo-minerales empleados en la aclimatización de las plantas.

Características de la formulación	Sustratos		
	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 <sup>3</sup> )	0.50	0.44	0.49
pH	7.40	7.40	7.40
Conductividad eléctrica (Ms.cm <sup>-1</sup> )	2.60	2.45	2.51
N (%)	2.38	2.81	2.90
P (%)	1.80	1.05	1.65
K (%)	0.45	0.22	0.39
Ca (%)	0.20	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

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<sup>-1</sup>) y masa seca (g planta<sup>-1</sup>). La masa fresca y seca, se determinaron en 20 plantas por repetición o 20 brotes en el caso de las estacas. Los datos fueron procesados mediante un análisis de varianza de clasificación simple.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

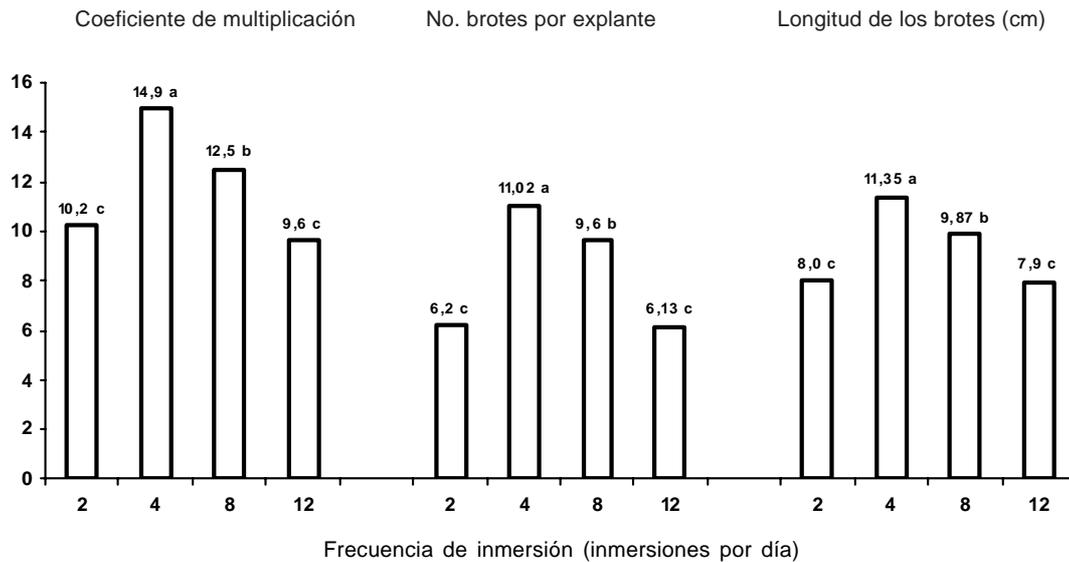
### Multiplicación de morera en Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)

#### *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 1).

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



$MG \pm EE$  (Coeficiente de multiplicación) =  $11.8 \pm 0.5$ . No. brotes por explante =  $8.23 \pm 0.31$ . Longitud de los brotes =  $9.28 \pm 0.2$

a, b, Medias con letras distintas en cada variable difieren para  $p < 0.05$  según la prueba de Tukey

Figura 1. 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

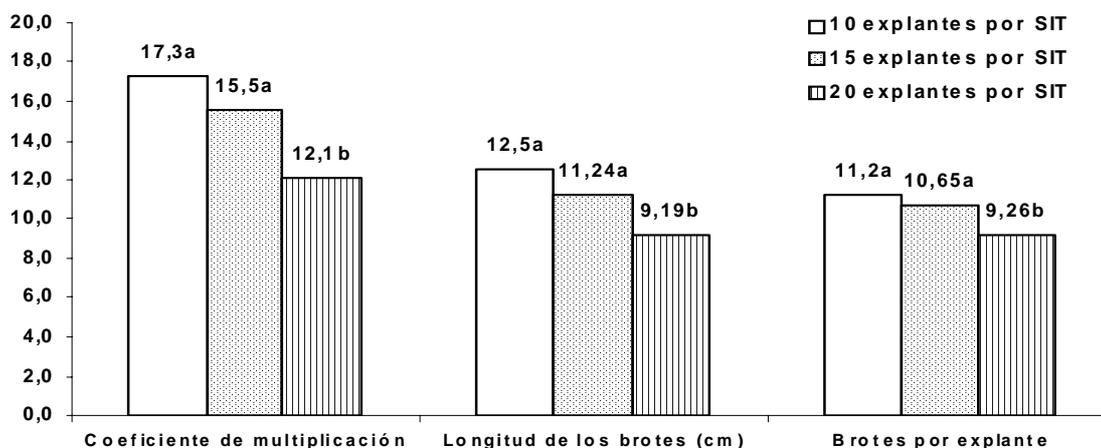
especie vegetal, no debe exceder de uno o dos minutos en las especies leñosas, para evitar la presencia de brotes con síntomas de hiperhidricidad (Cabasson *et al.*, 1997; Etienne-Barry *et al.*, 1999) y es suficiente para producir un incremento en la actividad de la superóxido dismutasa y una peroxidación 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 (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 *et al.*, 2003).

#### *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 2).



$MG \pm EE$  (Coeficiente de multiplicación) =  $14.97 \pm 0.71$ . Longitud de brotes =  $10.98 \pm 0.44$ . Brotes por explante =  $10.37 \pm 0.19$

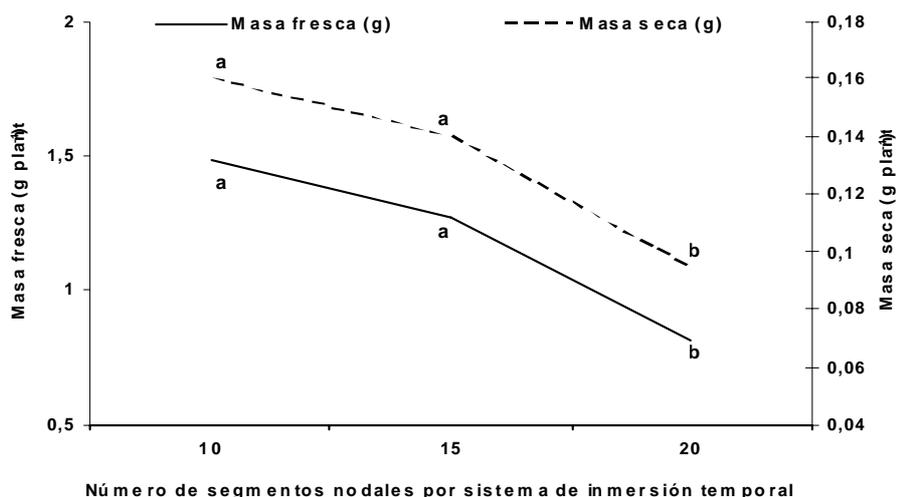
a, b. Medias con letras distintas en cada variable difieren para  $p < 0.05$  de acuerdo con Tukey

Figura 2. 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 3).

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 *et al.* (2004) en *Eucalyptus grandis* Hill ex Maden.



$MG \pm EE$  (Masa fresca) =  $1.19 \pm 0.08$ .  $MG \pm EE$  (Masa seca) =  $0.13 \pm 0.01$

a, b. Medias con letras desiguales en cada variable difiere para  $p < 0.05$  de acuerdo con Tukey

Figura 3. 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 sólo existen algunos estudios sobre el efecto que tiene la densidad de explantes por frasco sobre el crecimiento de los tejidos (McAlister *et al.*, 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 *et al.*, 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 diez 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 (Hvoslef-Eide *et al.*, 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'.

Murch *et al.* (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 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.

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* (Figura 4).



Figura 4. 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.

## Aclimatización

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 procedentes de los SIT y la combinación de humus de lombriz (85%) y zeolita (15%), el cual superó de forma significativa a las plantas obtenidas en medio de cultivo semisólido (Tabla 3, Figura 5).

Los resultados indicaron que el manejo realizado bajo condiciones de casa de cultivo garantizó una alta supervivencia de las plantas *in vitro* aunque las plantas provenientes de los sistemas de inmersión temporal fueron superiores a las plantas obtenidas en medio de cultivo semisólido.

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 (Shim *et al.*, 2003; Paz y Villegas, 2009).

El intercambio gaseoso o enriquecimiento del aire *in vitro* que ocurre en los sistemas de inmersión temporal, se le considera un elemento importante (Nguyen *et al.*, 2001) o factor clave 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 (Shim *et al.*, 2003).

Al evaluar el comportamiento de las plantas procedentes de los SIT comparadas con las obtenidas en medio de cultivo semisólido, Rodríguez *et al.* (2003) 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*.

Tabla 3. Influencia del tipo de sustrato sobre la aclimatización de las plantas *in vitro* de *Morus alba* L. variedad Criolla a los 45 días.

Tratamientos	Supervivencia (%)		Altura de la planta (cm)	Número de Hojas (u)
	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
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
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
±EE	0.008		0.35	0.08

a, b, c, d, e, f. Medias con letra distinta 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 PSS. Plantas procedentes de medio de cultivo semisólido. PSIT. Plantas procedentes de Sistemas de Inmersión Temporal

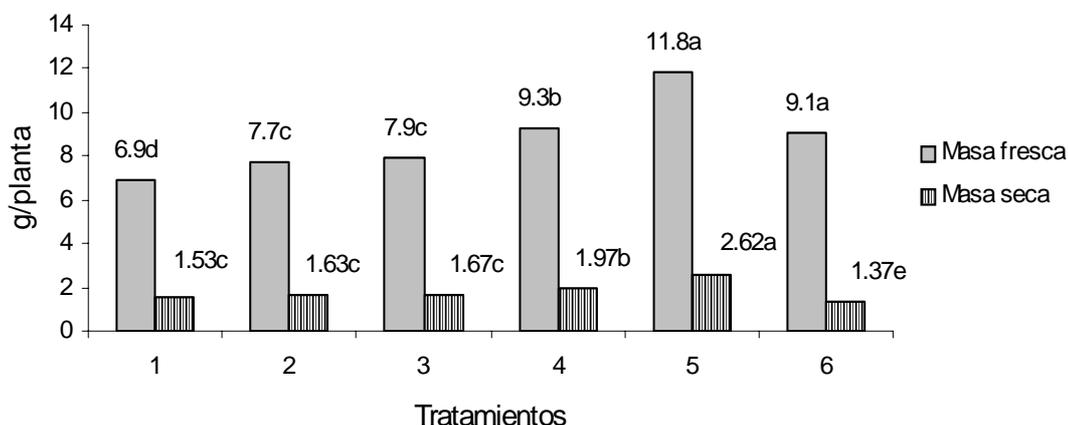
Dado que entre los factores que mayor influencia tienen en la aclimatación de las plantas *in vitro* se encuentran el tipo y composición del sustrato, el cual determina una adecuada retención de humedad y componentes químicos para proveer a la planta de agua y nutrientes, y al mismo tiempo ejerce una influencia significativa en la arquitectura del sistema radical influenciando el estado nutricional y la translocación de agua en las plantas se hace necesario prestar especial atención a su selección y uso (De Rezende *et al.*, 2007; Morales *et al.*, 2009).

Algunos autores como Jiménez-Terry *et al.* (2001) y Díaz *et al.* (2004), indicaron que el humus de lombriz como componente del sustrato tiene características necesarias para hacer más eficiente el proceso de aclimatación 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, 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 aclimatación (Agramonte *et al.*, 1998; Urbina *et al.*, 2006). Sin embargo, Salazar *et al.* (2005) y Jiménez-Terry *et al.* (2010) señalaron que no solo el tipo de sustrato beneficia la aclimatación de las plantas *in vitro*, sino también la procedencia y calidad morfológica de las plantas favorecen la aclimatación en condiciones de casa de cultivo, lo cual coincide con el comportamiento observado en este experimento.

Resultados similares a los observados en este experimento en la variable supervivencia



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:  $1.7 \pm 0.03$

Figura 5. 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 aclimatación. Tratamientos: 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 medio de cultivo semisólido en humus de lombriz 50% y zeolita 50%. 4. Plantas procedentes de sistemas de inmersión temporal en humus de lombriz 50% y zeolita 50%. 5. Medio de cultivo semisólido en humus de lombriz 85% y zeolita 15%. 6. Sistemas de inmersión temporal en humus de lombriz 85% y zeolita 15%.

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* Hemsl., *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.

La mayor cantidad de masa fresca y seca obtenida en las plantas procedentes de inmersión temporal (Figura 5), 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.

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 fresca y seca en plantas obtenidas en medio de cultivo semisólido al utilizar vermiculita - plantmax (1:1) y suelo - 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).

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 (Díaz *et al.*, 2004; Gnanam, 2004). Por su parte, Martínez *et al.* (2005) 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*.

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 sombreado 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.

## CONCLUSIONES

Fue posible la multiplicación *in vitro* de *Morus alba* L. variedad Criolla con el empleo de sistemas de inmersión temporal y se comprobó que con los estos se mejoró la calidad de las plantas y se incrementó el coeficiente de multiplicación.

## REFERENCIAS

- Agramonte, D, F Jiménez, MA Dita (1998) Aclimatización. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Pérez, JN (ed.). Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba pp. 193-206
- Agramonte, D, L Delgado, A Trocones, M Pérez, D Ramírez, F Jiménez-Terry, O Gutiérrez (2001) Micropropagación de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden a partir de segmentos nodales. Biotecnología Vegetal 1(2): 109-114
- Balakrishnan, V, M Ram Latha, KC Ravindran, J Philip Robinson (2009) Clonal propagation of *Morus alba* L. through nodal and axillary bud explants. Botany Research International 2(1): 42-49
- Berthouly, M, H Etienne (2005) Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En: Hvoslef-Eide, AK y W Preil. (eds.). Liquid culture system for

- in vitro* plant propagation. Springer. Netherlands pp. 165-195
- Bortolotti, AS, M Pasqual, AL Rezende, L Ferreira (2003) BAP e substratos na aclimazao de plântulas de gloxinia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.) provenientes de cultura de tecidos. Lavras. 27(2): 255-260
- Cabasson, C, D Alvard, D Dambier, P Ollitrault, C Teisson (1997) Improvement of Citrus somatic embryos development by temporary immersion. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 50: 33-37
- Castro, D, J González (2002) Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. Agricultura Técnica 62(1): 68-78
- Dandin, SB, VG Naik (2004) Biotechnology in mulberry (*Morus* spp.). Crop improvement: research directions and priorities. En: Plant Biotechnology and Molecular Markers. Srivastava, PS, A Narula, S Srivastava. (eds.). Anamaya Publishers pp. 206-216. New Delhi. India
- 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. Universidad Central de las Villas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. 53 p.
- Díaz, LP, LF Medina, J Latife, PA Digonzeili, SB Sosa (2004) Aclimatación de plantas micropropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz. RIA 33(2): 115-128
- García, DR, PE Lara, HF Magaña, E Aguilar, JR Sanginés (2009) Parámetros reproductivos en conejas alimentadas con morera (*Morus alba* L.) o tulipán (*Hibiscus rosasinesis*). Revista Verde 4(3): 90-98
- Gnanam, R (2004) Micropropagation of mulberry using shoot tip (or) nodal segments. Proceedings of Indian Academy
- Hvoslef-Eide, AK, C Munster, R Lyngved, PH Heyerdahl, OA Olsen (2003) Liquid culture systems for plant propagation. Acta Horticulturae 625: 173-183
- Jaramillo, CJ (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
- Jiménez-Terry, F A, D Agramonte, JN Pérez, D Ramírez, O Gutiérrez, M. Pérez (2001) Aclimatización de plantas *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. variedad Desiree. Biotecnología Vegetal 1(2): 103-108
- Jiménez-Terry F, D Agramonte, M Pérez (2010) Protocolo para la producción en casa de cultivo de minitubérculos de *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott. a partir de plantas *in vitro*. Biotecnología Vegetal 10 (3): 185-189
- Lu, MCh (2002) Micropropagation of *Morus latifolia* Poilet using axillary buds from mature trees. Scientia Horticulturae 96: 329-341
- Martínez, R, H Azpiroz, JL Rodríguez, V Cetina, M Gutiérrez (2005) Aclimatización de plantas obtenidas *in vitro* de *Eucalyptus urophylla* T. Blake y *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. Ra Ximhai 1(3): 591-597
- McAlister, B, J Finnie, MP Watt, 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
- Mehrotra, S, MK Goel, AK Kukreja, BN Mishra (2007) Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. African Journal of Biotechnology 6(13): 1484-1492
- Morales, C, J Corbera, VM Paneque, JM Calaña (2009) Efecto del sustrato en la aclimatización del cultivo de anturio (*Anthurium andreaenum*). Cultivos Tropicales. 29(3): 75-79
- Murashige, T, FS Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiology Plantarum 15: 173-197
- Murch, SJ, Ch Liu, RM Romero, PK Saxena (2004) *In vitro* culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia sujete*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78: 63-68
- Nelson, DL, MM Cox (2005) Principles of Chemistry. 4<sup>th</sup> Edition. pp. 631-655 y 690-750. W.H. Freeman and Company. New York
- Pattnaik, S, 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
- Paz, R, 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, MD de Sesar, N Zamuner, JL Danelón, 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
- Piao, XC, D Chakrabarty, EJ Hahn, KY Paek (2003) A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system. Current Science. 84(8): 1129-1132
- Rodríguez, R, M Daquinta, J Capote, D Pina, Y Lezcano, 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
- Salas J E, Agramonte D, Barbón R, Felipe Jiménez-Terry FA, Collado R, Pérez M, O Gutiérrez (2005) Propagación *in vitro* de *Morus alba* L. en medio de cultivo semisólido. Biotecnología Vegetal 5(2): 81 – 87
- Salazar, R, RA 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, TE Vargas, E García, M Oropeza (2005) Micropropagación y organogénesis de *Aster ericoides* cultivar «Monte Casino». Interciencia 30(5): 295-299
- Sánchez, M (2006) Morera: un Forraje Excepcional Disponible Mundialmente. Artículos técnicos-Agricultura. Dirección de Producción y Sanidad Animal. FAO
- Shim, SW, EJ Hahn, KY 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, m Tanaka (2005) Novel micripropagation system for *Eucalyptus urograndis*. Bragantia 64(3): 349-359
- SPSS (2008) SPSS for Windows Release 16.0. Standar Version. SPSS Inc. Chicago, Illinois
- Srivastava, S, R Kapoor, A Thathola, RP 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
- Tellería, T, Jiménez R (1989) Cultivos hidropónicos. Elementos tecnológicos. La Habana. 78 pp.
- Trocones, AG (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.
- Urbina, E, G Baca, R Núñez, M Colinas, L Tijerina, J Tirado (2006) Cultivo hidropónico de plántulas de jitomate en zeolita cargada con K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> o Mg<sup>2+</sup> y diferente granulometría. Agrociencia 40(4): 419-429