

Establecimiento *in vitro* de Morera

Salas, B J E , Agramonte, PD; Barbón, RR, Jiménez, TF, Collado, LR, Pérez, PM, Gutiérrez, MO, Ramírez, AD *Autor para correspondencia.

¹ Colegio de Postgraduados. Campus Tabasco. Km 3 carretera Cárdenas-Huimanguillo. CP 86 500. H. Cárdenas, Tabasco. México. e-mail: salas2001mx@yahoo.com.mx

² Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Carretera a Camajuaní km 5 1/2. CP 54 830. Santa Clara, Villa Clara. Cuba

RESUMEN

Se utilizaron yemas apicales como explantes los cuales fueron establecidos en el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog. En la desinfección se utilizó Hipoclorito de Sodio al 0.5, 1.0 y 1.5% durante 10, 15 y 20 minutos y la combinación de Hipoclorito de Sodio y etanol al 70%. Se determinó el porcentaje de contaminación microbiana y de supervivencia. En el establecimiento *in vitro* se evaluó la Influencia del 6-BAP y la kinetina en concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 mg l⁻¹ en cada una de ellas, tanto en medio de cultivo semisólido como líquido y se evaluaron los porcentajes de explantes brotados y de supervivencia así como la longitud de los brotes (cm). Con la combinación de Hipoclorito de Sodio al 1% y etanol al 70% (p<0.05) se redujo a 0.9% la contaminación microbiana y se mejoró la supervivencia de los explantes hasta 98.4%. En el establecimiento *in vitro* se observaron los mejores resultados con 6-BAP comparado con kinetina y el mejor tratamiento fue al utilizar 0.5 mg l⁻¹ de 6-BAP con el cual se obtuvo el 97.4 y 98.2% de los explantes brotados en el medio de cultivo semisólido y líquido respectivamente con diferencias estadísticas (p<0.05) con los demás tratamientos. De la misma manera para la variable longitud de brotes la cual fue de 4.91 y 5.06 cm y el valor más bajo de 2.42 y 2.8 cm se observó en el control.

Palabras clave: citoquinina, brotación, *Morus alba* L, yemas apicales

ABSTRACT

Apical buds like explants were used which were established in the culture medium proposed by Murashige and Skoog. In the disinfection sodium hypochlorite was used to the 0.5, 1.0 and 1.5% during 10, 15 and 20 minutes and the combination of sodium hypochlorite and ethanol 70%, evaluating microbial contamination (%) and survival (%). In the establishment it evaluated the Influence of the 6-BAP and kinetin using 0.5, 1.0 and 2.0 mg.l⁻¹ in each one of them, culture medium semisolid as liquid and the sprouted explants was evaluated (%), height of buds (cm) and survival (%). With the combination of sodium hypochlorite 1% and ethanol 70% (p<0.05) it decreased to 0.9% the microbial contamination and to improve to 98.4% the survival of explants. In the establishment better results were observed with 6-BAP compared with kinetin and the best treatment was using 0.5 mg.l⁻¹ 6-BAP the 97.4 and 98.2% of the explants sprouted respectively in the culture medium semisolid and liquid being obtained, being statistically different (p <0.05) with the other treatments; in the same way for height of buds which was of 4.91 and 5.06 cm and, the lowest value in 2.42 and 2.8 cm were observed in the control.

Key words: apical buds, cytokinin, *Morus alba* L, sprouting

INTRODUCCIÓN

La morera (*Morus alba* L.), el alimento tradicional para el gusano de seda, ha sido seleccionada y mejorada por calidad y rendimiento de hojas en muchos ambientes y se encuentra presente en varios países alrededor del mundo. Las hojas de morera son muy palatables y digestibles (75-90%) en los rumiantes y también pueden ser dadas a monogástricos. El contenido de proteínas de las hojas y tallos tiernos, con un excelente perfil de aminoácidos esenciales, varía entre 17-28% dependiendo de la variedad (Benavides, 2000).

El establecimiento de este forraje perenne es a través de estacas o de semilla, y la cosecha se puede hacer arrancando las hojas o cortando

ramas o la planta entera. El rendimiento depende de la variedad, la localidad (temperatura mensual, radiación solar y precipitación), densidad de plantas, aplicación de fertilizantes y técnica de cosecha. Las hojas pueden ser usadas como suplemento, reemplazando a los concentrados, en vacas lecheras, o como el alimento principal en cabras, ovejas, conejos, terneros o vacuno de carne, o como ingrediente en la dieta de cerdos y aves (Sánchez, 2002).

De todo lo anterior se desprende la importancia que tiene esta especie vegetal, ya sea para producción de leche o carne; y su necesidad de propagación por los métodos más avanzados y eficientes, por lo que el objetivo del presente trabajo fue el establecer la morera en condiciones de cultivo *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron explantes procedentes de plantas de Morera con dos años de establecidas en campo. Se utilizaron yemas apicales, las cuales fueron colectadas de rebrotes con tres meses de edad. Se lavaron con detergente y agua corriente durante 10 minutos, y se sometieron a desinfección con Hipoclorito de Sodio y etanol al 70% y finalmente se enjuagaron cuatro veces con agua desionizada estéril. Los platos metálicos utilizados para su manipulación fueron esterilizados a 180°C durante dos horas, mientras que las pinzas y bisturís se esterilizaron en solución de Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 1%.

El medio de cultivo basal estuvo compuesto por las sales inorgánicas del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) suplementado con 100 mg.l⁻¹ de mioinositol, 1 mg.l⁻¹ de tiamina y 30 g.l⁻¹ de sacarosa. La esterilización de los medios de cultivo se realizó en autoclave vertical a 121°C, 1.2 kg cm⁻² de presión y un tiempo de 20 minutos. El pH fue ajustado a 5.8 con soluciones de NaOH (1N) y HCl (1N) previo a la esterilización. Para la gelificación de los medios de cultivo se utilizó gelrite (Chemical Co.) a razón de 2 g.l⁻¹. Se emplearon tubos de ensayo, en los cuales se vertieron 15 ml de medio de cultivo implantando un explante en cada uno. Se utilizaron 20 tubos por tratamiento. El ensayo se repitió dos veces.

Los datos fueron analizados estadísticamente según el procedimiento multifactorial de SAS (Statistical Analysis System) versión 6.12 para Windows y la comparación de medias de Tukey.

Influencia del desinfectante

Este experimento se realizó con el objetivo de evaluar la efectividad del hipoclorito de sodio en la desinfección, solo y combinado con etanol al 70% utilizando tres concentraciones: 0.5, 1.0 y 1.5% durante 10, 15 y 20 minutos. Las evaluaciones se realizaron a los 21 días y las variables evaluadas fueron: contaminación microbiana (%) y supervivencia (%).

Influencia del 6-BAP en el establecimiento

Este experimento se realizó para observar la respuesta de los explantes a la adición de citoquininas, para ello se utilizó 0.5, 1.0 y 2.0 mg l⁻¹ de cada una de ellas y un control. Las evaluaciones se realizaron a los 28 días y se tuvieron en cuenta las siguientes variables: explantes brotados (%), longitud de los brotes (cm) y supervivencia (%).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia del desinfectante

La contaminación microbiana constituye un serio problema en el establecimiento y supervivencia de las plantas, la cual se manifiesta en cualquier parte del explante o en el medio de cultivo y provoca una seria afectación en el crecimiento del explante hasta ocasionarle la muerte (Jiménez, 1998).

Para contrarrestar el efecto de la contaminación, en las tablas 1 y 2 se aprecia que la utilización de un agente desinfectante puede disminuirla significativamente. Donde se utilizó hipoclorito de sodio como agente de desinfección (Tabla 1), se logró reducir la contaminación hasta un 8.5% y obtener valores de supervivencia de 85.8% con diferencias significativas ($p < 0.05$) en el tratamiento con 1% durante 20 minutos para las dos variables evaluadas.

Con la combinación de etanol e hipoclorito de sodio se logró reducir a 0.9% la contaminación y mejorar a 98.4% la supervivencia de los explantes en el tratamiento con etanol al 70% e hipoclorito al 1% durante 20 minutos. Estos resultados fueron diferentes estadísticamente ($p < 0.05$) comparados entre sí en cada variable (Tabla 2). Se puede observar también que los explantes expuestos a estos desinfectantes al mayor tiempo evaluado, mostraron diferencias ($p < 0.05$) comparado con la exposición de los explantes a 10 y 15 minutos, tanto en la contaminación como en la supervivencia.

Tabla 1. Efecto del hipoclorito de sodio (HS) sobre la contaminación y la supervivencia de yemas apicales de morera.

Tratamiento	Contaminación (%)	Supervivencia (%)
HS 0.5%, 10 minutos	46.7e	45.0e
HS 0.5%, 15 minutos	45.0e	49.2d
HS 0.5%, 20 minutos	25.0c	69.7b
HS 1.0%, 10 minutos	34.2d	49.2d
HS 1.0%, 15 minutos	32.5d	53.3c
HS 1.0%, 20 minutos	8.5a	85.8a
HS 1.5%, 10 minutos	35.9d	46.7e
HS 1.5%, 15 minutos	34.2d	50.8d
HS 1.5%, 20 minutos	16.2b	53.3c

Medias con letras desiguales en la misma columna difieren para $p < 0.05$ según prueba de Tukey

Tabla 2. Efecto del etanol (E) al 70% e hipoclorito de sodio (HS) sobre la contaminación y la supervivencia de yemas apicales de morera.

Tratamiento	Contaminación (%)	Supervivencia (%)
E 70% e HS 0.5%, 10 minutos	20.0c	66.7e
E 70% e HS 0.5%, 15 minutos	20.9c	70.0d
E 70% e HS 0.5%, 20 minutos	5.5b	93.4b
E 70% e HS 1.0%, 10 minutos	18.4c	71.7d
E 70% e HS 1.0%, 15 minutos	19.2c	75.0c
E 70% e HS 1.0%, 20 minutos	0.9a	98.4a
E 70% e HS 1.5%, 10 minutos	19.2c	66.7e
E 70% e HS 1.5%, 15 minutos	20.0c	70.0d
E 70% e HS 1.5%, 20 minutos	4.7b	63.4e

Medias con letras desiguales en la misma columna difieren para $p < 0.05$ según la prueba de Tukey

De manera general la combinación de etanol e hipoclorito de sodio proporcionó los mejores resultados en las variables evaluadas. Se observó como valor más alto en contaminación 20.9% y 66.7% como valor más bajo en la supervivencia de los explantes utilizados. Además, el uso del hipoclorito de sodio al 1.5% fue letal debido a la muerte de los explantes por clorosis y necrosis. Al respecto, García *et al.* (2002) refieren que la utilización de bajas concentraciones de HS durante largos periodos, resultan decisivas en la desinfección, ya que disminuye la muerte del explante por clorosis y necrosis y disminuye las contaminaciones persistentes por lo tóxico que resulta.

Por otro lado, Sanginés *et al.* (1999) observaron altos niveles de contaminación en los tejidos de morera a pesar de las altas concentraciones de cloro comercial aplicadas y sólo obtuvieron una reducción del 20% en la contaminación al asperjar las plantas donadoras en campo con Agrimicin 500. En este sentido, Cassells (1991) mencionó que los microorganismos pueden alojarse en los estomas, lenticelas o cualquier otra abertura natural en la planta, lo cual dificulta la eliminación de los mismos y, que los explantes tomados de plantas en crecimiento y plantas con ápices meristemáticos cubiertos son más fáciles de desinfectar que los explantes de plantas adultas o árboles.

De acuerdo con Leifert *et al.* (1994) y Alvarado (1998), los microorganismos contaminantes pueden provenir de diferentes puntos dentro del proceso del cultivo de tejidos, entre otros, la ineficiente desinfección de los explantes, deficientes técnicas de asepsia, mala esterilización de los medios de cultivo, fallas en el funcionamiento de las cabinas de flujo laminar o a través del ambiente. Sin embargo, Vijaya-Chitra y Padmaja (2002) informaron valores de 40, 25 y 15% de contaminación en yemas apicales de morera

cuando los explantes fueron muestreados en el invierno, otoño y verano, respectivamente utilizando etanol al 70% durante un minuto seguido de 15 minutos en bicloruro de mercurio al 0.1%.

En este trabajo, se logró reducir a 0.9% la contaminación y aumentar la supervivencia a 98.4% de los explantes expuestos a etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 1% ambos durante 20 minutos. Esto concuerda con los resultados obtenidos por García *et al.* (2002) quienes refirieron una supervivencia máxima de 98.11% en yemas de morera expuestas a etanol 70% por un minuto, hipoclorito de sodio al 0.01% y una gota de Tween-80 por 15 minutos, eliminando las bases cloróticas y hojas de cubierta y cinco minutos en bicloruro de mercurio al 0.01%.

Influencia del 6-BAP en el establecimiento

Usualmente en los meristemos, ápices o yemas la citoquinina endógena es baja debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces, por lo que la adición exógena de este regulador de crecimiento en los medios de cultivo para el establecimiento es generalizada (Jiménez, 1998).

No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en los tratamientos evaluados para el porcentaje de supervivencia. En este experimento (Tabla 3) se observó mejor comportamiento en las variables estudiadas utilizando 6-BAP como regulador de crecimiento comparado con la kinetina. En el porcentaje de explantes brotados, donde se utilizó 0.5 mg.l⁻¹ de 6-BAP se obtuvo el 97.4 y 98.2% de los explantes brotados en los medios de cultivo semisólido y líquido respectivamente, siendo estadísticamente diferente ($p < 0.05$) con los demás tratamientos. Con 2 mg.l⁻¹ de kinetina se obtuvo el valor más bajo en el medio de cultivo semisólido: 70.4%.

Tabla 3. Influencia de 6-bencilaminopurina (6-BAP) en el establecimiento de yemas apicales de morera.

Tratamiento (mg.l ⁻¹)	Explantos brotados (%)		Altura (cm)	
	Semisólido	Líquido	Semisólido	Líquido
Control	80.0b	83.8b	2.42c	2.80c
0.5 6-BAP	97.4a	98.2a	4.91a	5.06a
1.0 6-BAP	81.6b	85.3b	4.06b	4.21b
2.0 6-BAP	73.3c	75.1c	2.84c	3.17c
0.5 KIN	79.3b	84.4b	2.64c	3.19c
1.0 KIN	80.1b	89.3b	3.92b	4.10b
2.0 KIN	70.4c	76.2c	2.45c	2.84c

Medias con letras desiguales en la misma columna difieren para $p < 0.05$ según la prueba de Tukey

De la misma manera para la variable longitud de los brotes la cual fue de 4.91 y 5.06 cm, el valor más bajo fue de 2.42 y 2.80 cm y se observó en el control. En su trabajo de investigación García *et al.* (2002), obtuvieron un factor de multiplicación de 2.20 en morera al utilizar en el medio de cultivo MS con 0.05 mg.l⁻¹ de 6-BAP y mencionan que esta especie necesita de citoquinina para su crecimiento y desarrollo *in vitro*.

Por su parte, Menard *et al.* (1985) mencionaron que altas concentraciones de citoquininas produjeron vitrificación al establecer yemas apicales de morera en un medio de cultivo que contenía 1 mg.l⁻¹ de 6-BAP. Sin embargo, Sanginés *et al.* (1999) refirieron que las yemas establecidas en el medio de cultivo MS, suplementado con 2 mg.l⁻¹ de 6-BAP mostraron un crecimiento normal y buenos signos de desarrollo foliar en comparación con los explantes sometidos a un medio de cultivo suplementado con auxinas o giberelinas donde se observaron algunas anomalías como la deformación de hojas y agrietamiento de tallos. Esto es probablemente debido a las altas concentraciones de auxina exógena y a que los ápices y meristemas son áreas de síntesis de auxinas por lo que la concentración endógena de las mismas es alta (Vázquez y Torres, 1980; Hu y Wang, 1983).

Resultados diferentes refieren Vijaya-Chitra y Padmaja (2002), quienes obtuvieron mejores resultados con 2,4-D y kinetina que con 6-BAP en el establecimiento de yemas apicales de *Morus alba* L. variedad China White y mencionaron a la kinetina como la mejor citoquinina para esta variedad. En este sentido, Ma *et al.* (1996) informaron de un 75 a 80% de semillas de morera brotadas al sumergirlas durante 30 minutos en una solución 500 mM de ácido indolbutírico incubadas en oscuridad por 10 a 12 días y posteriormente durante dos semanas a fotoperiodo de 16 horas diarias. Por su parte, Sahoo *et al.* (1993) indicaron un 98% de regeneración de yemas apicales de morera encapsuladas en alginato de sodio con un medio de cultivo MS y 1 mg.l⁻¹ de 6-BAP.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que:

Con la utilización combinada de etanol e hipoclorito de sodio en la desinfección de yemas apicales de morera se logró reducir la contaminación microbiana hasta 0.9% y mejorar la supervivencia a 98.4% donde se incluía la inmersión de los explantes en etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 1% durante 20 minutos cada uno.

La adición de 6-BAP en el medio de cultivo para el establecimiento de yemas apicales de morera fue significativa en la brotación de los explantes y longitud de los mismos comparada con la kinetina, siendo mejor el tratamiento con 0.5 mg.l⁻¹ para estas variables.

REFERENCIAS

- Alvarado, C Y (1998) Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: Pérez Ponce, PJ (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. pp. 81-104. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" las Villas. Santa Clara.
- Ashmore, S E y Engelman, E (1997) Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetics resources. IPGRI. p67 Roma.
- Benvides, JE (2000) La morera, un forraje de alto valor nutricional para la alimentación animal en el trópico. Pastos y Forrajes. Revista de la Estación de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey". 23: 1-14
- Benvides, JE, Borel, R y Esnaola MA (1986) Evaluación de la producción de forraje del árbol de morera (*Morus sp.*) sometido a diferentes frecuencias y alturas de corte. Resumen de las investigaciones realizadas en rumiantes menores, cabras y ovejas en el proyecto de Sistemas de Producción Animal. Serie Técnica. Informe Técnico No. 67. p. 74. CATIE. Turrialba
- Cassells, AC (1991) Problems in tissue culture. Culture contamination. En: Debergh PC y RH Zimmerman (eds.). Micropropagation. pp. 31-45. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht

- García, M, Prieto M, Lugo, Y, Miliam, L y Cepero L (2002) Estudios preeliminares sobre micropropagación de *Morus alba*. Una nueva contribución para el ecosistema ganadero. Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey". <http://lead.virtualcentre.org/es/en/BTJ%20Taller/garciamaynevis.htm>
- Hu, CV y Wang, JP (1983) Meristem, shoot tip and bud culture. En: Evans, DA, Ammirato, PV y Yameda, Y (eds.). Handbook of plant cell culture. 1, pp.177-227. McMillan Publishing. New York
- Jiménez, E (1998) Cultivo de ápices y meristemas. En: Pérez Ponce JN (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología, pp. 45-56. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas, Santa Clara
- Leifert, C, Morris, CE y Waites, WM (1994) Ecology of microbial sacrophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. Critical Reviews in Plant Science 13: 139-183
- Ma, F, Guo, C, Liu, Y, Li, M, Ma, T, Mei, L y Hsiao, AI (1996) *In vitro* shoot apex grafting of mulberry (*Morus alba* L.). Horticultural Science 31: 460-462
- Menard, D, Coumans-Guilles, MF, Leclercq, N y Gaspar, T (1985) A technique of micropropagation applicable to small fruiting trees. Biotechnology Abstract 50: 333-335
- Murashige, T y Skoog, FS (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiology 15: 173-197
- Sánchez, MD (2002) Mulberry: an exceptional forage available almost worldwide. En: Sánchez, MD (ed.). Mulberry for animal production. Paper 147, pp. 161-172. Animal Production and Health Division. FAO. Roma
- Sahoo, Y, Pattnaik, SK, y Chand, PK (1993) Micropropagation of mulberry using alginate encapsulated shoot buds. In vitro cellular and Developmental Biology 29(3): 90 A
- Sanginés, GJR, Lara, LPE, Rivera, LJA, Pinzón, LL, Ramos, TO, Murillo, J, Itra, M, Fuentes, CC y Azcorra, G (1999) Avances en los programas de investigación en morera (*Morus alba* L.) en Yucatán. I Congreso Internacional sobre Morera. Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey". Matanzas.
- Soo-Ho, L, Younr-Taek, K, Sang-Pong, L, In-Jun, R, Jung-Sung, L y Byung-Ho, L (1990) Sericulture training manual. FAO. Agricultural Services Bulletin No. 80. 117 p. Roma
- Vázquez, VE y Torres, S (1980) Fisiología Vegetal. Crecimiento y desarrollo. pp. 317-372. Ed. Pueblo y Educación. Ciudad de la Habana
- Vijaya-Chitra, DS y Padmaja, G (2002). Seasonal influence on axillary bud sprouting and micropropagation of elite cultivars of mulberry. Scientia Horticulturae 92: 55-68