



MINISTERIO DE EDUCACIÓN SUPERIOR

UNIVERSIDAD DE GRANMA

Facultad de Ciencias Agrícolas

Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI “LA MANÁ”

TRABAJO DE DIPLOMA

**Formación de callos en el cultivo de la morera
(*Morus alba* L.)**

TESIS

En opción al título de Ingeniero agrónomo

Autores: Luis Fernando Cholo Masapanta

Hugo Bolívar Delgado Rodríguez

Tutor: MSc. Ángel Espinosa Reyes

2011

“Año 53 de la Revolución”



Y ustedes, compañeros, hoy no tienen más que un deber: el deber de estudiar. Con ese deber están pagando todas las deudas que pueden contraer con la sociedad, con esta sociedad presente, y con todos los héroes que se inmolaron para hacerla posible.

Ernesto Che Guevara.

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios por su infinita bondad al darme su bendición para cumplir con mi propósito.

A mi esposa Carmen Rosa Briones Pérez y a mis hijos Hugo David y Evelyn Nataly Delgado Briones por darme todo su apoyo y son quienes me impulsan a seguir adelante.

A toda mi familia y la familia de mi esposa por apoyarme de una u otra manera, que me animaron a realizar este sacrificio.

A mi tutor Ángel Espinosa Reyes por dirigir con responsabilidad, esmero y desinteresadamente mi trabajo de tesis,

A las Universidades Técnica de Cotopaxi de Ecuador y Universidad de Granma en la República de Cuba por albergarme en sus aulas, a sus Directivos y personal Docente.

Y a todas las personas que de una u otra forma supieron brindarme su apoyo moral que fue fundamental para culminar mi Carrera Universitaria.

A todos les digo un DIOS LES PAGUE.

Agradecimientos

Les agradezco con toda mi alma y mi corazón a todas aquellas personas que de una u otra forma hicieron posible la culminación de este trabajo:

A mi tutor Ángel Espinosa por contribuir a la ejecución de este trabajo, por su gran apoyo y constante estímulo, el cual me sirvió de mucha ayuda.

Al colectivo de Biotecnología Vegetal quienes siempre me apoyaron cuando los necesité.

A mi padre y a mi madre que desde el cielo me estará dando bendiciones, al amor de mi vida y a mis dos hijas queridas, a mis hermanas y hermano, quienes me apoyaron en todo momento.

A todos los profesores que, intervinieron directa o indirectamente durante mi estancia en la universidad.

DEDICATORIA

*El presente trabajo está dedicado a la mujer más bella, mi adorada esposa Carmen Rosa Briones Pérez, por haberme dado una familia, la felicidad a mi vida, que siempre esta adelante dándome impulso para seguir, por haberse sacrificado y renunciado a todo, porque ha marcado mi vida de tal manera que nunca podre olvidar su inmensa bondad. .
.Te Amo.*

A mis dos Hijos Hugo David y Evelyn Nataly Delgado Briones que han estado animándome constantemente y por lo sufrido por mi ausencia, por ello son mi inspiración y el motivo de superación. Los Adoro.

A mi madre, mis Hermanos, a mi padre y Hermano que desde el seno del Señor me deben estar apoyando, a mis suegros, a mis cuñados y cuñadas a mis sobrinos y a todos mis familiares y amigos que siempre estuvieron pendientes de mis actos, para darme el apoyo necesario y por ello siempre estarán ocupando en mi corazón el lugar que se merecen.

Dedicatoria

Este trabajo le dedico a dios y a mi padre y a mi madre que desde el cielo me estará dando bendiciones, al amor de mi vida y a mis dos hijas queridas, a mis hermanas y hermano, ya que siempre me apoyaron en los momentos más difíciles.

INDICE

I.-INTRODUCCIÓN	1
II.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1.-Generalidades del cultivo	3
2.1.2.-Multiplicación y siembra de la morera en condiciones de producción	5
2.1.3.-Aplicaciones de la morera	6
2.2.-Aplicación del cultivo de tejidos vegetales al cultivo de la morera	6
2.2.1.-Generalidades del cultivo de tejidos vegetales	6
2.2.2.-Micropropagación	7
2.2.3.Organogénesis	7
2.2.4.-Ventajasy desventajas de la micropropagación	8
2.2.5.-Factores que intervienen en la micropropagación	9
2.2.6.-Empleo de reguladores del crecimiento en el cultivo <i>in vitro</i>	11
2.2.7.-Etapas de la micropropagación de plantas	13
2.2.8.-Variación somaclonal	16
III.-Materiales y Métodos	17
IV.-Resultado y discusión	20
V.-Conclusiones	29
VI.-Recomendaciones	30
VII.-Bibliografía	31

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Granma, con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración de 2,4-D y el tipo de explante en la formación de callos en morera (*Morus alba L*), se utilizaron como explantes, limbos foliares, peciolo y tallo y se evaluaron diferentes concentraciones de 2,4-D (0; 0,5; 1,0; 2,0 mg/L). En los tratamientos en los cuales no se utilizó 2,4-D no se formaron callos. En todos los explantes y medios de cultivo con 2,4-D, a los 15 días ocurrieron cambios morfológicos, que evidenciaron el inicio de formación de los callos. A los 30 días se obtuvo el 100% de formación de callos en todos los tipos de explantes. El color de los callos formados varió desde crema claro hasta amarillo oscuro, en dependencia del tipo de explante empleado. El tamaño de los callos y la formación de raíces a partir de los mismos estuvieron directamente relacionados con la concentración de 2,4-D empleada. Los explantes de hojas, formaron callos con mejores características y mayor número de raíces.

ABSTRACT

The present work was carried out in Plants Biotechnology study Center of the University of Granma, with the objective of evaluating the effect of the concentration of 2,4-D and the explants type in the formation of callus in mulberry (*Morus dawn L*), foliates limbs, petioles and stems were used as explants, and different concentrations of 2,4-D were evaluated (0; 0,5; 1,0; 2,0 mg/L). Callus were not formed in the treatments in which 2,4-D was not used. In all the explants and medium with 2,4-D, the morphological changes occurred within 15 days, that evidenced the beginning of formation of the callus. Thirty days later 100% of formation of callus was obtained in all the explants types. The color of the formed callus varied from clear cream until dark-yellow, in dependence of the type of the explants used. The size of the callus and the formation of roots for the same ones were directly related with the concentration 2, 4-D used. The explants of leaves, formed callus with better characteristics and bigger number of roots.

I. INTRODUCCIÓN

La morera (*Morus alba* L.) es un árbol forrajero de origen asiático perfectamente adaptado a las condiciones del trópico. Pertenece a la familia Moraceae. Existen 24 especies agrupadas en el género *Morus* y una subespecie, con al menos 100 variedades conocidas (Machii *et al.*, 2000). La especie diploide *Morus alba* es considerada la más extendida.

El uso principal de la morera a nivel mundial es como alimento del gusano de la seda (Sánchez, 2006). Dependiendo de la localidad, también es apreciada por su fruta que puede ser consumida fresca, en jugo o en conservas, como vegetal en algunos países se consumen sus hojas y tallos tiernos, por sus propiedades medicinales en infusiones y como forraje animal. (Cepeda, 1991). Es sorprendente, sin embargo, que una planta que ha sido utilizada y mejorada para alimentar a un animal con requerimientos nutricionales elevados, como es el gusano de seda, haya recibido una atención limitada por ganaderos, técnicos e investigadores pecuarios (Tikader y Roy, 1999). Hay lugares donde el follaje de morera se usa tradicionalmente en la alimentación de rumiantes, como en la India, China y Afganistán, pero fue a partir de los años ochenta que empezó el interés en su cultivo intensivo y su uso en la alimentación de animales domésticos (Chakraborty *et al.*, 2000); Almeida y Fonseca, 2006).

La primera referencia en Cuba sobre los métodos de multiplicación de la morera data de la primera mitad del siglo XX (Fernández, 1935). Posteriormente se han introducido y evaluado algunas variedades comerciales como la Criolla, Indonesia, Cubana, Tigriada y Acorazonada, y los híbridos procedentes de Brasil: IZ-64, IZ-13/6, IZ-40, IZ-15/7 e IZ-56/4. Su proceso de introducción y generalización en Cuba, ha conllevado al desarrollo de diversos estudios de evaluación y/o caracterización de variedades entre las que se destaca la variedad Acorazonada (Martín *et al.*, 1998; Vargas *et al.*, 2002).

La morera como planta arbustiva desde la década del 80 se incluye como alternativa en la alimentación para rumiantes en países de América Central, recomendada por la calidad de su follaje (Mederos *et al.*, 1999). Sus hojas pueden tener más del 46% de aminoácidos esenciales (Machii, 1992), más del 20% de proteína cruda y entre el 70 y el 80% de digestibilidad *in vitro* de la materia seca (Benavides, 1994), además, tiene un alto contenido de minerales

(hasta 17% de cenizas), con valores elevados de calcio y fósforo (Sánchez, 1999).

En estudios realizados por Oviedo (1995), utilizando sólo morera como suplemento a vacas en pastoreo en el trópico húmedo, obtuvo una producción de leche de 13 kg/animal/día, la cual, no difirió significativamente de la obtenida con concentrados comerciales. Los primeros informes en la micropropagación de morera se realizaron por el científico japonés Ohyama (1970), quien obtuvo las primeras plántulas completas de morera a partir de brotes axilares, desde entonces, se han realizado numerosos informes en el cultivo de tejidos en morera con la utilización de diferentes explantes (Thomas, 2002).

Con el propósito de desarrollar un programa que permita obtener un germoplasma bien adaptado a las condiciones ambientales y con mejores niveles de resistencia genética a la antracnosis, Mesa *et al.*, (1993) determinaron las condiciones necesarias para la obtención de plántulas de este cultivo en condiciones *in vitro*.

Varios autores han sugerido la utilización del cultivo de células y tejidos con la transformación genética directa de los explantes (Quecini y Vieira 2001; Fuentes *et al.*, 2005), lo que ha permitido que el cultivo de tejidos haya sido aplicado con éxitos en varias especies, lográndose un rápido establecimiento y multiplicación *in vitro* (Lu, 2002).

Problema:

Carencia de una metodología eficiente para la formación de callos en el cultivo de la morera (*Morus alba* L.)

Hipótesis:

Es posible la formación de callos en el cultivo de la morera a partir de diferentes explantes y diferentes concentraciones de 2,4-D.

Objetivo General:

Evaluar el efecto de la concentración de 2,4-D y el tipo de explante en la formación de callos en morera (*Morus alba* L.).

Objetivos Específicos:

- Determinar el tipo de explante más eficiente en la formación de callos.
- Evaluar diferentes concentraciones de 2,4-D en la formación de callos de morera (*Morus alba* L.).

II-. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1-. Generalidades del Cultivo.

Origen y distribución.

Tanto el árbol como el cultivo de morera (*Morus alba* L.) proceden de Asia y fueron desconocidos en occidente, hasta que, en el siglo VI a través de La Ruta de la Seda, fue introducida por los monjes nestorianos. Es ampliamente cultivada en la región de Murcia para la cría de gusano de la seda, industria muy floreciente en el pasado, no en vano la seda producida en dicha región tuvo fama mundial (Toral *et al* 2001). A través del proyecto del gusano de la seda, esta ha sido llevada a muchos países en todo el mundo, encontrándose desde las áreas templadas de Asia y Europa, los trópicos de Asia África y América Latina (FAO, 1990).

En Cuba, se introdujeron cuatro variedades procedentes de Costa Rica en 1996 y aunque ya en el país existían algunos árboles de la especie *Morus alba* y no existían programas de investigación para su estudio. Posteriormente se desarrollaron un conjunto de investigaciones relacionadas con la agrotecnia, conservación, nutrición y producción animal en ovinos, caprinos conejos, cerdos y bovinos (Milera *et al.*, 2003).

Clasificación taxonómica y descripción botánica

Reino: *Plantae*

División: *Spermatophyta*

Clase: *Magnoliatae*

Orden: *Urticales*

Familia: *Moraceae*

Género: *Morus*

Especie: *Morus alba*

En diversos países se conoce con otros nombres comunes: Amoreira (Brasil), Maulbeerbaum (Alemania), Mulberry (Inglés).

Características botánicas

Es una especie leñosa, de porte bajo con hojas verde claro, brillosas, con venas prominente. Sus ramas son grises a gris amarillentas y sus frutos son de color morado o blanco que miden entre 2,0-6,0 cm de largo (Benavides, 1995).

Recursos genéticos

La especie diploide *Morus alba* ($2n=28$) es la más extendida. Presenta hojas gruesas y grandes de color verde oscuro y producen un gran número de hojas por hectárea.

Existe una gran variación en la producción de hojas y en su calidad (contenido de proteína) entre las especies de morera más cultivadas en diferentes localidades y bajo condiciones diversas de suelo y medio ambiente, lo que demuestra su potencial para identificar el germoplasma apropiado para muchos sistemas de producción. En Cuba muchas de las variedades cultivadas localmente (locales o criollas) parecen comportarse adecuadamente, comparadas con otras introducidas (Sánchez, 2002)

Aspectos agroecológicos

Los rangos climáticos para el cultivo de la morera se comportan de la forma siguiente: temperatura desde 18 a 38°C, precipitaciones desde 600- 2500 mm; fotoperiodo de 9-13 horas/día y año y humedad relativa de 65-80% (Sierra, 2006).

Su cultivo se plantea que puede realizarse desde una altura que oscila desde el nivel del mar hasta los 4000 msnm (Soo-Ho et al., 1990). Su propagación puede realizarse por semillas, acodos, injerto y estacas. La propagación por estacas es la más utilizada, las estacas pueden ser plantadas de forma directa y su longitud no debe sobrepasar los 40 cm (Velásquez, 1992)

En Cuba se realizan estudios fitopatológicos con el fin de conocer que patógenos afectan el cultivo de la morera e investigar los efectos que pueden ocasionar las medidas fitotécnicas en el manejo de estos agentes dañinos. Se ha determinado que la morera puede ser afectada por diferentes patógenos (hongos, bacterias y micoplasmas) entre los que se encuentran: *Gibberella moricola*, *Pseudomonas mori*, *Aecidium mori*, *Rosellinia necatrix*, *Phyllactinia moricola* y *Helicobasidium mumpa* (Lazcano et al., 2002).

La morera no tolera suelos de mal drenaje ni compactados y es una planta que requiere fertilización ya que realiza grandes extracciones de nutrientes del suelo, no obstante se ha comprobado que responde bien a la fertilización orgánica. Estudios realizados por Sierra (2006), indican que se han obtenido

más de 50 toneladas de forraje verde comestible por hectárea de morera al aplicar estiércol de cabra al suelo.

2.1.2.- Multiplicación y siembra de la morera en condiciones de producción.

El método de siembra más común mundialmente es por esquejes, pero en ciertos lugares se prefiere la semilla. El sembrar por semillas asegura un sistema radicular más profundo, con mayor capacidad para encontrar agua y nutrientes, que se reflejará en mayor productividad y más larga longevidad. Las ventajas de la reproducción vegetativa (por esquejes) son la garantía de las características productivas, la facilidad de obtención de material y la facilidad de siembra (Sánchez, 2002).

La longitud de las estacas debe ser de 25 - 40 cm de largo y tener no menos de tres yemas, deben ser tomadas de ramas lignificadas. En el momento de la plantación, las estacas deben enterrarse de 3-4 cm de profundidad. El rebrote de las estacas no se produce de forma simultánea, obteniéndose más del 90% de rebrote entre los 4 a 35 días, seguido de la aparición de las primeras hojas (Velásquez, 1992).

La densidad de siembra recomendada es de 0,45 m entre plantas y 1,0 m entre surcos. En zonas húmedas o con riego, se puede plantar durante todo el año (Oviedo *et al.*, 1994).

Algunos países como España recomiendan para su plantación asociarlo con otros cultivos como: maíz, papa, hortalizas, alfalfa y frutales, siempre que se controle el espaciamiento y la poda para evitar la competencia por la luz (Benavides, 1999).

Cosecha y conservación de forraje.

Para alimentar al gusano de la seda se cosechan las hojas en forma individual, o los rebrotes en toda la rama, dependiendo de los requerimientos alimenticios de las larvas y de los costos. Al gusano se les ofrece el follaje fresco, aunque se están desarrollando de forma experimental otras metodologías (FAO, 1988). Para la alimentación de los rumiantes, el método preferido ha sido el corte de toda la planta o las ramas a mano, aunque se puede predecir que el corte mecánico sea usado en el futuro para facilitar la alimentación en fresco a gran escala o para el secado artificial (FAO, 1988).

La conservación de forraje de morera por medio del ensilado ha sido lograda con éxito (Gonzales *et al.*, 1994; Oviedo *et al.*, 1994). Las láminas de las hojas se secan al sol en unas horas, pero se requiere más tiempo para los peciolos y tallos. Para acelerar el proceso de secado de los tallos se realizan algunos tratamientos de acondicionamiento al follaje como es pasar un rodillo, con lo cual se facilitará el secado de los tallos y se evitará el deterioro de la calidad nutritiva de las hojas por exposición excesiva a los rayos solares. Las variedades diploides se secan más rápidos, ya que tienden a tener más estomas por unidad de área foliar (Govindan *et al.*, 1988).

El rendimiento de la biomasa y la proporción de sus hojas varía con la especie y la variedad. El clima (precipitación y radiación solar) y la fertilidad del suelo, son factores determinantes en la productividad (Espinosa, 1998).

2.1.3- Aplicaciones de la morera.

El uso principal de la morera a nivel mundial es como alimento del gusano de la seda, pero dependiendo de la localidad también es apreciada por la fruta (consumida fresca, en jugo o en conservas), puede consumirse también como vegetales (hojas y tallos tiernos), por sus propiedades medicinales, en infusiones (te de morera) y como forraje animal (Cepeda, 1991).

El follaje posee un valor nutricional, que alcanza el 25% de proteína bruta con una digestibilidad superior al 80% (Milera *et al.*, 2003). En las hojas y tallos tiernos posee compuestos fenolicos, flavonoides, carbohidratos solubles, alcaloides, saponinas y esteroides en cantidades que no afectan la salud de los rumiantes (Milera *et al.*, 2003)

2.2.- Aplicación del cultivo de tejidos vegetales al cultivo de la morera.

2.2.1. Generalidades del cultivo de tejidos vegetales.

El cultivo de tejidos puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones aséptica de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales (Pérez *et al.*, 1998).

Los orígenes del cultivo de tejidos se remontan a 1902 con los primeros intentos realizados por Haberlandt de cultivar células aisladas de plantas, quien postuló el principio de la totipotencia celular como base teórica sobre la que se sustenta el cultivo de tejidos (Pérez y Gómez, 1998.).

Dentro de la Biotecnología, el cultivo de tejidos constituye la técnica que mayor aporte práctico ha brindado. Sus aplicaciones van desde estudios teóricos sobre la Fisiología y Bioquímica Vegetal hasta la obtención de plantas libres de patógenos, propagación masiva, conservación de germoplasma, producción de metabolitos secundarios, mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones y la selección *in vitro* y la Ingeniería Genética (Pérez *et al.*, 1998).

A partir de los avances alcanzados en la regeneración *in vitro* se ha desarrollado una industria de micropropagación que se inició en los países desarrollados de Europa y Estados Unidos y se ha extendido al resto del mundo con una producción de más de 50 millones por año (Vasil,1994).

Los métodos de transformación genética para la introducción de genes de interés agrícola en plantas también se ven beneficiados por el cultivo de tejido, sin embargo, la no disponibilidad de sistema de regeneración eficiente en los genotipos de mayor importancia comercial entre los que se encuentran las especies leguminosas ha sido la principal limitante para su utilización en un mayor número de especies (Pérez, 2006).

2.2.2- Micropropagación

La multiplicación vegetal es comúnmente denominada micropropagación masiva y abarca diferentes técnicas como son: la proliferación de brotes axilares, la formación de nuevas yemas axilares (Organogénesis) y la embriogénesis somática. La producción de plantas a partir de yemas axilares ha demostrado ser el método más confiable de la propagación *in vitro* ya que se asegura la estabilidad genética, por lo que constituye la vía de multiplicación más utilizada (Gamboa y Núñez, 2001)

2.2.3- Organogénesis

La organogénesis se refiere al proceso en el cual las células pueden ser inducidas para formar plantas completas. Se caracteriza por la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de este en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o indirecta a partir de callos (Jiménez, 1998).

Generalmente se produce por la optimización de la relación citoquinina – auxina en el medio de cultivo, y ocurre por la diferenciación de órganos y brotes

directamente del explante o del callo, pudiendo desarrollarse de una única célula o de un conjunto de células, la cual se caracteriza por ser una estructura unipolar con una amplia conexión vascular de los órganos formados con un explante (Pérez, 2006).

Los callos son en principio un tejido no organizado y poco diferenciado, sin embargo, se puede encontrar tejidos diferenciados en agregados grandes de tejidos callosos. Cuando se examina un tejido de callos puede verse que está lejos de ser homogéneo al estar generalmente constituido por tejidos no diferenciados (Jimenez, 1998).

Después de conseguir la inducción, el callo se subcultiva en un medio de cultivo fresco con iguales componentes que el medio de inducción, pero las concentraciones de auxina y citoquininas son normalmente más bajas o sin la presencia de ellas. El primer repicado suele llevarse a cabo en un medio sólido, aunque en algunos casos es posible empezar en un medio líquido. Si el crecimiento del callo se detiene después del repicado, indica que el medio no resulta adecuado. En ocasiones el callo no es viable sobre los medios sintéticos por lo que se debe añadir sustancias como: leche de coco, hidrolizado de caseína, extracto de malta o levadura (Cuello, 1998).

En contraste con la embriogénesis somática en la organogénesis para formar una planta ya sea vía directa o indirecta, se requiere de una secuencia de medios de cultivo, ya que aquellos que inhiben la formación de las raíces favorecen el desarrollo vegetativo y viceversa (Pérez *et al.*, 1998).

Ziv (1999), planteó que el proceso organogénico se inicia con cambios en una célula o un conjunto de ellas y solamente un pequeño número de células del explante dan lugar a una formación del callo, que luego regenera plantas.

2.2.4 Ventajas y desventajas de la micropropagación.

Algunos sistemas de micropropagación han mostrado ventajas con respecto a algunos sistemas convencionales de propagación. La más importante según, Zayas (2005) son:

- Los cultivos se llevan a cabo con piezas muy pequeñas de la planta (explantes) y en algunas especies la micropropagación ha demostrado que solamente requiere de un pequeño espacio para mantener un elevado número de plantas en condiciones asépticas.

- Las plantas se hallan libres de hongos, bacterias, y materia orgánica.
- Las técnicas *in vitro* son adecuadas cuando se requieren especialmente de un alto volumen de producción que por vías convencionales son difíciles de lograr.
- Las plantas pueden adquirir nuevas características temporales a través de la micropropagación que las hace más deseables para el agricultor que las plantas cultivadas en forma convencional.

Algunos inconvenientes o desventajas de la micropropagación son según Gamboa y Núñez (2001) las siguientes:

- Las plantas obtenidas son inicialmente pequeñas y a veces tienen características indeseables.
- Los explantes cultivados *in vitro* para sobrevivir tienen que crecer en un medio de cultivo que contenga sacarosa u otra fuente de carbono.
- Los cultivos *in vitro* inicialmente no son autótrofos y deben pasar un periodo de aclimatización antes que sean capaces de crecer en condiciones de producción.
- El cultivo en frascos de vidrio provoca una alta humedad relativa provocando que las plantas jóvenes sean más susceptibles a la pérdida de agua en ambientes externos, por esta razón debe incluirse una atmósfera con un lento decrecimiento de la humedad y enrarecimiento de la luz para facilitar su adaptación en las condiciones ambientales y la posibilidad de obtener plantas genéticamente aberrantes pueden incrementarse.

2.2.5- Factores que intervienen en la micropropagación

El **estado fisiológico de las plantas donadoras** es un aspecto de gran influencia en la morfogénesis. Como regla general se puede decir que cuanto más joven e indiferenciado se encuentre el explante a cultivar, mejor será su respuesta *in vitro*. Es por ello, que los meristemas apicales y axilares son ampliamente usados en numerosas especies.

En el caso de la micropropagación de plantas leñosas, la edad del explante es un factor crítico. Si los tejidos son jóvenes la micropropagación tiene mayores posibilidades de ser exitosa que con tejidos maduros. Este hecho genera la

necesidad de realizar tratamientos de rejuvenecimiento de las plantas donadoras de explantes (Echenique *et al.*, 2004).

El **tamaño del explante** influye en la posibilidad de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos. La probabilidad se incrementa si se emplean explantes mayores, aunque de este modo se exagera también la posibilidad de que los cultivos se contaminen con microorganismos.

También es necesario tener en cuenta que existe un tamaño mínimo del explante, que depende de la especie y del material vegetal, por debajo del cual no es fácil lograr el establecimiento de los cultivos. Los explantes muy pequeños suelen requerir del empleo de medios más complejos o de los denominados medios acondicionados (Echenique *et al.*, 2004).

La **época del año** es un factor que suele tener mucha importancia en la micropropagación y que generalmente está asociado al grado de dormancia que presentan ciertos explantes (yemas) y también con la posibilidad de mayor o menor proliferación de microorganismos (Echenique *et al.*, 2004).

La **atmósfera gaseosa** es un factor determinante en los procesos morfo génicos y está condicionada por el tipo y tamaño de los frascos seleccionados así como por el sistema de cobertura de los mismos (Radice, 2004).

El **ambiente *in vitro*** se caracteriza por alta humedad relativa, temperatura constante, bajo nivel de densidad de flujo de fotones fotosintéticos, fluctuación en la concentración de CO₂, alta concentración de azúcar, sales y reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, acumulación de sustancias tóxicas y ausencia de microorganismos. Esto causa bajos niveles de transpiración, absorción de nutrientes y CO₂, así como un alto nivel de respiración en la oscuridad, lo que resulta en un pobre crecimiento celular (Barbón, 2003).

El **genotipo** es un factor determinante en todos los procesos morfogénicos desde la capacidad del explante para su establecimiento en condiciones *in vitro* como para la proliferación de callos o la diferenciación y crecimiento de nuevos órganos (Radice, 2004). La capacidad de regeneración de un explante depende en gran medida del genotipo, incluso dentro de la misma especie, lo

que refleja diferencias en el poder de activación de las rutas embriogénicas (Parrot, 1993).

Es conocido que **la luz y la temperatura** han sido consideradas los factores físicos más importantes en la micropropagación. La **luz** es uno de los factores que determina el desarrollo de los organismos autótrofos, en ello radica la importancia de controlar la luz en los cultivos *in vitro* (Pelacho *et al.*, 2002).

El **fotoperiodo** puede afectar los niveles internos de los reguladores del crecimiento, los cambios en la intensidad luminosa pueden causar organogénesis y cambios morfológicos específicos debido a la longitud de onda de la iluminación (Pérez, 2006). Determinadas longitudes de onda son las que mejor aprovechan las plantas para realizar sus funciones vitales de fotosíntesis, fototropismo o fotomorfogénesis y son concretamente las del rojo y el azul (Escobar, 2000).

2.2.6- Empleo de reguladores del crecimiento en el cultivo *in vitro*

Los reguladores del crecimiento y el desarrollo de la planta actualmente se agrupan en cinco categorías: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno. Estas son sustancias endógenas insustituibles para la planta, pues en su interrelación deciden el crecimiento y las bases para su desarrollo. Se encuentran íntimamente relacionadas con las zonas de crecimiento en las plantas y son las encargadas de desencadenar todos los procesos que ocurren en los tejidos (Takahashi *et al.*, 1995).

Además de estas sustancias naturales reguladores (endógenos) existen numerosos productos de síntesis que pueden utilizarse como reguladores del crecimiento en el cultivo *in vitro* (González *et al.*, 2007). Dentro de los reguladores del crecimiento vegetal, se encuentran un grupo de sustancias de elevada actividad biológica, que generalmente se desplaza desde su lugar de síntesis con cierta dirección y velocidad hasta el lugar de acción, causando un efecto de crecimiento específico o de diferenciación (González *et al.*, 2007), entre los que se encuentran:

Auxinas: De las auxinas naturales el ácido indolacético (AIA) es el compuesto más utilizado en los medios de cultivo, pero es sensible a la degradación

enzimática (AIA-oxidasa) y a la fotooxidación. También se utiliza un número de sustancias que provocan un efecto fisiológico similar y que se producen sintéticamente; son las llamadas “auxinas sintéticas” como son: el 2,4 ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA) y el ácido indolbutírico (AIB) (González *et al.*, 2007). El AIA se emplea en concentraciones que varían de 0,001 - 10,0 mg/L, con un óptimo alrededor de 1,0 - 5,0 mg/L, mientras que el ANA se utiliza en concentraciones levemente mayores (1,0 - 10,0 mg/L) con un óptimo cerca de 2 mg/L (González *et al.*, 2007). En algunas investigaciones donde se han estudiado varias auxinas se ha observado que el AIA y el ANA promueven la formación de estructuras embriogénicas, mientras que el 2,4-D estimula la formación de callos de menor tamaño, poco compactados y con menor capacidad de regeneración (Trejo *et al.*, 2002).

En las angiospermas, el AIA regula ambas fases del desarrollo embrionario a través de diversos mecanismos tales como vías alternativas para la biosíntesis de auxinas, control de niveles de auxinas y gradientes de concentración (Ljung *et al.*, 2002).

Citoquininas o Citocininas: Las citocininas juegan un importante papel en la regulación de la división celular e intervienen al igual que las auxinas en el control de muchos aspectos del crecimiento y del desarrollo de las plantas. La formación de raíces, parte aérea y callos en el cultivo de tejidos son reguladas por la disponibilidad e interacción de estas dos clases de reguladores del crecimiento (Frank y Schmölling, 1999).

Las citocininas son derivados purínicos, en especial derivados de la adenina, que se han reportado en pequeñas cantidades en el agua de coco, jugo de tomate, extractos de flores, tubérculos y nódulos radicales, en frutos y semillas inmaduras de maíz (zeatina) hidrolizadas de ARNt de plantas o microorganismos (González *et al.*, 2007).

Entre las citoquininas naturales tenemos la zeatina, isopentenil-adenina (IPA), dimetilamino-purina, dihidroxizeatina, metilzeatina. Son citoquininas sintéticas la kinetina (6-furfunil aminopurina), el 6-bencilaminopurina (6- BAP).

Además de esas citoquininas derivadas de las purinas, han sido descritas otras citoquininas no purínicas como el thidiazuron (TDZ) y el CPPU (N-2-cloro-4-piridil N-fenil urea). Estos compuestos tienen una actividad histoquímica muy alta y son muy eficientes en las plantas maderables (González *et al.*, 2007).

Giberelinas: Son diterpenos (con C₂₀; C₁₉), derivados de la vía isoprenoide, con una estructura básica denominada esqueleto gibánico o giberelano; la giberelina más difundida es el AG₃ (ácido giberélico). Estas hormonas endógenas se emplean poco en cultivo *in vitro* ya que hay numerosas experiencias que indican un efecto inhibitorio sobre la organogénesis y, particularmente la rizogénesis (Crozier, 1981).

Ácido Abscísico (ABA): Este compuesto es clasificado como un inhibidor del crecimiento vegetal, ha sido muy empleado para la maduración de embriones somáticos, facilita la aclimatación, formación de bulbos y tubérculos y promueve el desarrollo de la dormancia (González *et al.*, 2007).

Etileno: Única hormona gaseosa conocida la cual estimula la senescencia de las hojas y la maduración de los frutos, promueve o inhibe la regeneración adventicia en dependencia del tiempo de aplicación o del genotipo (González *et al.*, 2007).

2.2.7- Etapas de la micropropagación de plantas

Debido a la información acumulada, la mayoría de los micropropagadores de plantas en el mundo están de acuerdo en que realmente se pueden diferenciar 5 fases críticas para lograr una exitosa multiplicación de plantas (Murashige y Skoog, 1962).

- **Fase 0 (Preparativa):** Esta etapa inicial comprende la selección de la planta madre y la aplicación de una serie de pretratamientos en condiciones higiénicas controladas, cuyo objetivo es mejorar la eficiencia en el desarrollo posterior de los cultivos *in vitro*.
- **Fase I Establecimiento o Iniciación de los cultivos:** El objetivo de esta fase es establecer el cultivo *in vitro* el explante o primordio con los cuales iniciar el proceso de propagación.

- **Fase II Multiplicación:** Se considera la etapa más importante del proceso, donde se debe garantizar la propagación de los brotes y la estabilidad genética de las plantas producidas.
- **Fase III Enraizamiento:** Corresponde al enraizamiento o etapa de pretrasplante, tiene como objetivo producir una planta autótrofa que puede sobrevivir en condiciones de trasplante al suelo.
- **Fase VI Acclimatización:** Es la fase final del proceso por tanto su meta es lograr que la planta esté lista para su trasplante definitivo a campos comerciales de producción o invernadero.

Fase 0. (Preparativa).

Existe un consenso de que es importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de micropropagación eficiente y repetible. La misma tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso, desde el punto de vista sanitario, fisiológico y genético (Zayas, 2005).

Fase. I Establecimiento o Iniciación

El objetivo de esta etapa es lograr un cultivo axénico y viable, fisiológicamente vigoroso con el cual iniciar el proceso de multiplicación. Una vez seleccionado el explante se requiere desinfectarlo suficientemente, por la razón de que en el medio de cultivo pueden crecer bacterias y hongos que competirán ventajosamente con el explante (Pérez *et al.*, 1998).

El cultivo *in vitro* puede iniciarse prácticamente a partir de cualquier parte de la planta, sin embargo, la fuente inicial del material vegetal puede determinarse para el éxito de las plantas en el establecimiento del cultivo. Generalmente se aconseja utilizar plantas sanas y vigorosas de aquellas partes que se encuentran en división activa, como las regiones meristemáticas de las plantas, por lo que es recomendable utilizar las plantas más jóvenes como fuentes de explantes (Rossel, 1990).

Los desinfectantes más utilizados son el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (Ca(ClO)₂), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), etanol y dicloruro de mercurio (HgCl₂), además se pueden añadir algunas gotas de Tween-20 (Zayas, 2005).

Fase II. Multiplicación *in vitro*

Es la fase más importante y determinante en todo el programa de propagación *in vitro*, es aquella que realiza la verdadera multiplicación con la micropropagación de una especie o variedad definiéndose no solo el número de plantas y propágulos a obtener, sin embargo debe vigilarse su calidad genética debido a que en esta fase pueden producirse variantes somaclonales (Maceo, 2007).

El objetivo de esta fase es la producción del mayor número posible de propágulos, plantas, microtubérculos o microbulbillos a partir de explantes ya establecidos *in vitro* sin sacrificar los objetivos de la fase siguiente (Pérez *et al.*, 1998).

Fase III. Enraizamiento *in vitro*

Se caracteriza por ser la fase más voluminosa de todo el proceso. En ella cada brote o yema de forma individual que se ha formado durante la fase de multiplicación debe desarrollar raíces que le permitan comenzar la absorción de nutrientes al transplantarse sobre un sustrato adecuado y convertirse en una planta aclimatada lista para ser llevada al campo (Orellana, 1998).

Para lograr la mayor eficiencia biológica en esta fase deben manejarse varios factores entre ellos: medios de cultivos simples y de ser posible en estado líquido, uso de componentes del medio de cultivo con sustancias químicas de calidad técnica, luz natural como fuente de iluminación, frascos de cultivo con dimensiones adecuadas para cada especie, disminuir el riesgo de contaminación (Pérez, 1998).

Fase IV. Aclimatación

Durante el cultivo *in vitro* las plantas crecen en condiciones de baja intensidad luminosa, alta humedad relativa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios de cultivos ricos en compuestos orgánicos, especialmente sacarosa. Estas condiciones provocan cambios en la morfología y fisiología de las plantas que las hacen diferir de las que crecen en invernaderos o en el campo (Barranco, 2001).

Estos cambios provocan que una gran parte de las plantas micropropagadas no sobrevivan al trasplante a condiciones ambientales, lo que hace necesario aplicar técnicas de aclimatación *in vitro* y *ex vitro* que garanticen un retorno

gradual de éstas a sus características morfológicas normales (Agramonte *et al.*, 1998).

Para evitar el exceso de transpiración de las plantas hasta que éstas logren un adecuado desarrollo de los estomas y la cutícula es necesario mantener una alta humedad relativa mediante el riego o colocando cobertores de polietileno sobre las plantas y retirándolos unos días después (Agramonte *et al.*, 1998).

2.2.8- Variación somaclonal

La inestabilidad genética es uno de los problemas más importantes asociados con el cultivo de tejidos de las plantas. Esta inestabilidad genética conocida como “variación somaclonal”, se manifiesta cuando una parte de las plantas obtenidas por medio de la micropropagación no son similares a la planta madre (Medero, 2006).

Los mecanismos de la variación somaclonal no están totalmente claros y probablemente se deban a cambios en el número y estructura de los cromosomas, reordenamientos cromosómicos, el crossing-over somático, amplificación del ADN, deleciones, transposomas y la mutación del ADN. Los cambios epigenéticos ocurren frecuentemente pero, se ha demostrado que este tipo de variación no se segrega a la progenie, ni cumple con las leyes de la herencia (Medero, 2006).

Las plantas propagadas *in vitro* como resultado del rejuvenecimiento o cambios temporales muestran variaciones tales como: incremento en el número de tallos, retardo en la floración, aumento de la susceptibilidad a enfermedades y otras características que influyen en el rendimiento en campo (Medero, 2006).

III- MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación fue desarrollada en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal (CEBVEG) perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Granma en el período comprendido entre septiembre de 2010 a enero de 2011.

Condiciones generales para el trabajo en el laboratorio

El pesaje de los componentes de los medios de cultivo se realizó en una balanza analítica modelo (SARTORIUS) y el pH de los medios de cultivo se ajustó a 5,7 con un medidor de pH, (CRISON) antes del autoclaveado. Los medios de cultivo y los instrumentos (pinzas y bisturís) fueron esterilizados en autoclave vertical a 121°C de temperatura y a 1,2 kg. cm⁻² de presión durante 25 minutos.

La manipulación del material vegetal se efectuó en la cabina de flujo laminar (FASTER) empleando para su desinfección etanol al 70%. El instrumental, durante el trabajo en el flujo laminar, se esterilizó en el Steric a una temperatura de 250°C.

Material vegetal

Las estacas de morera (*Morus alba L.*) empleadas en la presente investigación pertenecen a la variedad acorazonada según la identificación realizada por especialistas de la Estación de Pastos y Forrajes de Indio Hatuey, Matanzas. El material vegetal se tomó del banco de germoplasma de morera existente en la casa de cultivo del Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal.

Se cortaron 50 estacas de 3 yemas con un diámetro promedio de 1,4 cm y una longitud media de 20 cm. Las estacas se trasladaron al laboratorio y luego se colocaron en frascos con agua para propiciar la germinación de las yemas (Figura 1).



FIGURA 1. Estacas de morera brotadas en agua

Los esquejes se mantuvieron en condiciones semicontroladas de laboratorio y de luz natural.

Obtención de callos de morera.

Este experimento se desarrolló con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración de 2,4-D y el tipo de explante en la formación de callos.

Explantos empleados:

Se emplearon 3 tipos de explantes tomados de los brotes obtenidos de las estacas. Los explantes utilizados fueron: limbos foliares, pecíolos y tallos (Figura 2)



FIGURA 2. Diferentes tipos de explantes utilizados en la investigación.

Los explantes se lavaron por separado y cuidadosamente y se mantuvieron en agua con detergente, durante 30 minutos en agitación continua, posteriormente se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril.

La desinfección se realizó en la cabina de flujo laminar, utilizando hipoclorito de sodio al 1% de cloro activo, durante 15 minutos. Luego se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril. Los limbos foliares se seccionaron en porciones de 0,5 X 0,5 cm de longitud, seleccionando la zona central, los pecíolos y los tallos se cortaron en segmentos de 1 cm de longitud.

El medio de cultivo basal estuvo compuesto por sales Murashige y Skoog (1962), vitaminas MS, mioinositol 100 mg/L y sacarosa 30 g/L, el pH se ajustó a 5,7 y se solidificó con agar 6 g/L. Se evaluaron diferentes concentraciones de 2,4-D, conformando los siguientes tratamientos:

Tratamiento 1. Sin 2,4-D

Tratamiento 2. 0,5 mg/L de 2,4-D

Tratamiento 3. 1,0 mg/L de 2,4-D

Tratamiento 4. 2,0 mg/L de 2,4-D

Los explantes fueron sembrados en los medios de cultivo a razón de uno por frasco, que contenían 10 ml de medio de cultivo. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, empleando 20 frascos por cada tratamiento, donde cada frasco fue considerado como una repetición. La incubación se desarrolló en la oscuridad a temperatura de 25°C y humedad relativa entre de 60 y 65%. Las variables evaluadas a los 15 y 30 días fueron:

- Desinfección (%)
- Inicio de la formación de los callos (días)
- Zona de formación de los callos
- Coloración de los callos
- Formación de callos (%)
- Tamaño de los callos
- Formación de raíces (%)

Análisis estadístico de los resultados

Para todos los datos se aplicó un análisis de comparación de proporciones, utilizando el programa estadístico STATISTICA versión 6.0 sobre WINDOW, para un 5% de probabilidad del error.

IV. RESULTADO DE DISCUSIÓN.

La desinfección es un paso indispensable en el proceso de establecimiento de los cultivo *in vitro*, la misma constituye unos de los pasos más importantes, que garantiza todo el proceso, por eso es necesario evaluar siempre esta variable.

En la figura 3, se muestran los resultados alcanzados en la desinfección de los diferentes tipos de explantes, puede observarse que en todos los tratamientos, se logró el 100% de explantes desinfectados, estos resultados indican la eficiencia del método de desinfección empleado y corroboran que el empleo de explantes procedentes de estacas brotadas en condiciones semicontroladas de laboratorio (Elías, 2008), disminuye en un alto valor la contaminación microbiana en este cultivo, por lo cual podemos decir que constituye un método eficiente para ser utilizado en los programas de cultivo *in vitro* de la morera.

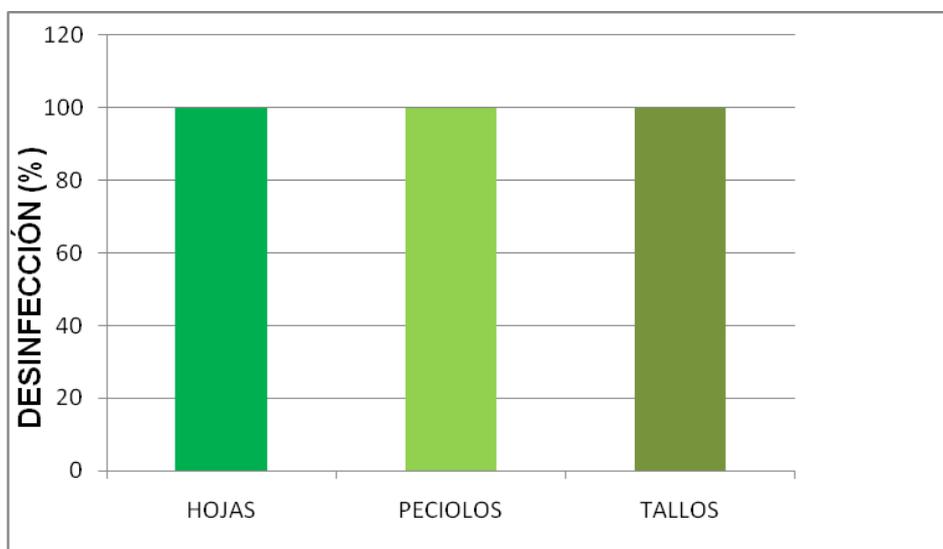


FIGURA 3. Respuesta de la desinfección en los diferentes tipos de explantes.

Los resultados obtenidos en la presente investigación fueron muy superiores a los obtenidos por Elías (2008), al evaluar la desinfección de pecíolos, tallos y hojas de *Morus alba L* var. *Acorazonada* obteniendo valores de desinfección por debajo del 50%, en los diferentes tipos de explantes evaluados, con diferencias significativas entre ellos. En estudios realizados por Salas, (2004), se logran buenos resultados en la desinfección con hipoclorito de sodio al 1% durante 20 minutos en explantes de hojas de morera.

Con el objetivo de buscar un método de desinfección para los explantes de *Morus alba* García *et al.* (2002), señalaron la utilización de bicloruro de mercurio y bajas concentraciones de hipoclorito de sodio.

A los 15 días se observó el inicio de la formación de los callos, en los diferentes explantes, en todos los tratamientos en los cuales se utilizó el 2,4-D. En las hojas el inicio de la formación de los callos se hizo evidente, cuando las mismas comenzaron a arrugarse y se separaron del medio del cultivo. Los limbos foliares tomaron una coloración verde claro y se pudo apreciar, la formación, de pequeñas protuberancias en los bordes donde se produjeron los cortes y en la nervadura principal (Figura 4).

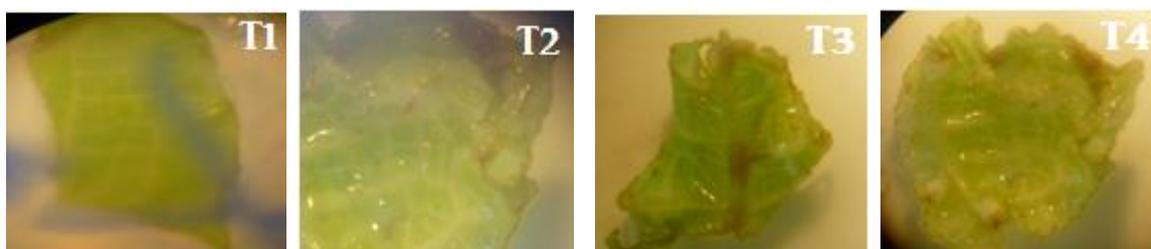


FIGURA 4. Inicio de la formación de callos en hojas de morera, en medio de cultivo con 2,4-D.

En los explantes de pecíolos a los 15 días se observó el inicio de la formación de los callos (Figura 5). En el tratamiento 1 no se observaron cambios en los explantes que indicaran el inicio de la formación de callos. En todos los tratamientos en los cuales se utilizó 2,4-D aparecieron cambios morfológicos en los explantes expresados a través de un engrosamiento de la parte central y se evidencia el inicio de la formación de tejido indiferenciado en los tejidos de cicatrización. Estos cambios morfológicos y el desarrollo de los callos fueron más evidentes en los tratamientos en que se utilizó mayor concentración de 2,4-D alcanzaban mayor desarrollo (T3 y T4).

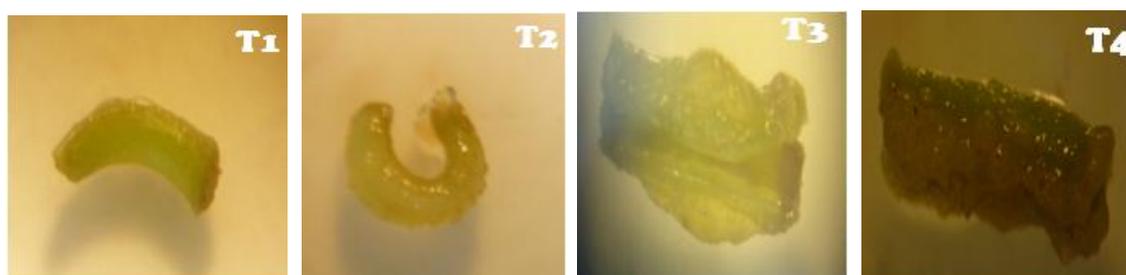


FIGURA 5. Inicio de la formación de callos en peciolo de morera, en medio de cultivo con 2,4-D.

En los tallos la formación de los callos se inicia en la zona en que se produjeron los cortes, es decir en el tejido de cicatrización, evidenciado por el crecimiento de tejido indiferenciado, formando una masa amorfa de células. El resto del explante tomó una coloración parda oscura. Este fenómeno se observó en los tratamientos en los que se empleó el 2,4-D (Figura 6)

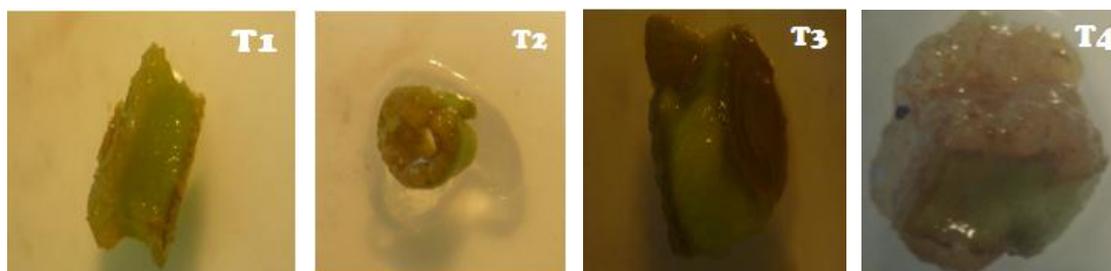


FIGURA 6. Inicio de la formación de callos en tallos de morera, en medio de cultivo con 2,4-D.

En todos los tratamientos, en que se formaron los callos para los diferentes tipos de explantes, fueron de un color crema claro, y alcanzaban un tamaño aproximado al grado de desarrollo. No se observó la formación de raíces ni brotes.

La formación de callos, ha sido considerada como un mecanismo de defensa para evitar la penetración de agentes extraños, al producirse cortes en los tejidos de las plantas. Puco y Venegas (2010), observaron el inicio de la formación de callos de *Dianthus caryophyllus* L. a los 5 días después de establecidos, comenzando su formación por un engrosamiento de las nervaduras de las hojas, seguido por la aparición de tejido indiferenciado en los bordes del explante. Gonzales (2007), observó que el inicio de la formación de los callos en el cultivo del boniato ocurrió en las células perivasculares del haz, con un posterior crecimiento en todas direcciones, que dio lugar a que el callo se hiciera notable y se proyectara al exterior a través de la epidermis.

Elías (2008), observó en la primera semana de cultivo la ocurrencia de cambios morfológicos y abultamiento en los bordes del explante como respuesta de este a la formación de callos, cuando utilizó diferentes tipos de explantes para la formación de callos de *Morus alba*. Resultados similares han sido informados en café por Santana (1994), al emplear segmentos de hojas para inducir la

formación de callos, los cuales se iniciaron en zonas donde fueron seccionados, resultados que coinciden con los obtenidos en el presente trabajo. En trabajos realizados por Vaca y Romero (2009) informaron el inicio de la formación de callos de morera en diferentes tipos de explantes en el cultivo de la morera variedad acorazonada, en las dos primeras semanas del cultivo, lo cual coincide con los resultados alcanzados en la presente investigación.

Sanginés *et al*, (2002), lograron producir callos al cultivar peciolo, limbo y yemas axilares de *Morus alba* en medios de cultivo con 5 mg/L de BAP y 0,25 mg/L de 2,4-D, los callos formados tuvieron buena apariencia.

Al evaluar los diferentes tratamientos a los 30 días, se observó la formación de callos en los diferentes tipos de explantes y medios de cultivo. En la figura 7, se muestran los resultados obtenidos en la formación de callos y raíces utilizando las hojas como explantes en los diferentes tratamientos.

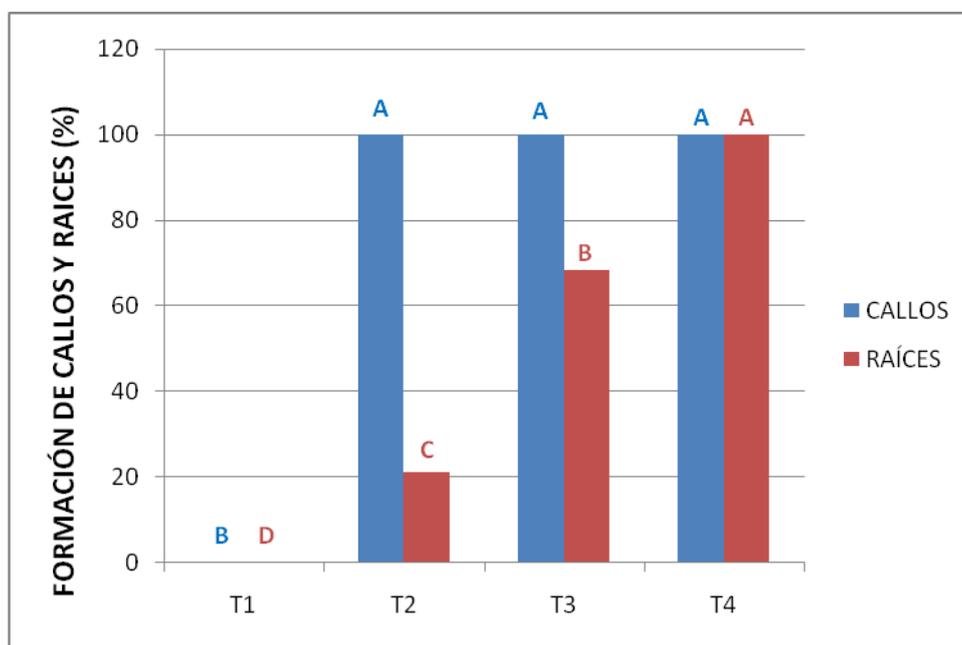


FIGURA 7. Formación de callos y raíces en explantes de hojas en los medios de cultivo con diferentes concentraciones de 2,4-D. Medias con letras diferentes difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según prueba de comparación de proporciones.

En el tratamiento 1, en el cual no se aplicó 2,4-D no se produjo la formación de callos. En todos los tratamientos en los cuales se utilizó el 2,4-D se formaron callos en el 100% de los explantes. Estos resultados indican el efecto del 2,4-D

en la formación de callos, demostrándose la fuerte actividad auxínica de este regulador del crecimiento así como su capacidad de producir crecimientos desordenados en las células del explante. La formación de raíces estuvo directamente relacionada con la concentración de 2,4-D utilizada, es decir fue aumentando a medida que se incrementó la concentración de la auxina, alcanzándose los mayores valores cuando se utilizó 2,0 mg/L con un 100% de explantes con raíces.

En los explantes de hojas, los callos aparecen en los bordes donde se ha producido los cortes y sobre la nervadura principal (Figura 8). Los callos aparecen como pequeños agrupamientos de células de color crema, con una consistencia friable. El crecimiento de las raíces se produjo a partir de los callos, lo que indica la ocurrencia de una organogénesis indirecta. El tamaño de los callos y el número de raíces fue mayor en los tratamientos tres y cuatro, en los cuales se utilizaron mayores concentraciones de 2,4-D.

Vaca y Romero (2009), obtuvieron callos en el cultivo de la morera de un color amarillo-parduzco en la totalidad de los explantes evaluados y su coloración no dependió de las concentraciones de 6-BAP y de 2,4-D empleadas. Elías (2008) logró en sus estudios callos de morera de color marrón amarillenta, lo que atribuyó a la presencia de fenoles.



FIGURA 8. Formación de callos y raíces en explantes de hojas a los 30 días en los diferentes tratamientos.

A los 30 días, en los explantes de peciolo se obtuvieron altos porcentajes de formación de callos en los tratamientos en los cuales se emplea 2,4-D (Figura 9). La formación de raíces, fue muy baja, alcanzando solamente un 7,14% en el tratamiento 3, en el resto de los tratamientos no se formaron raíces.

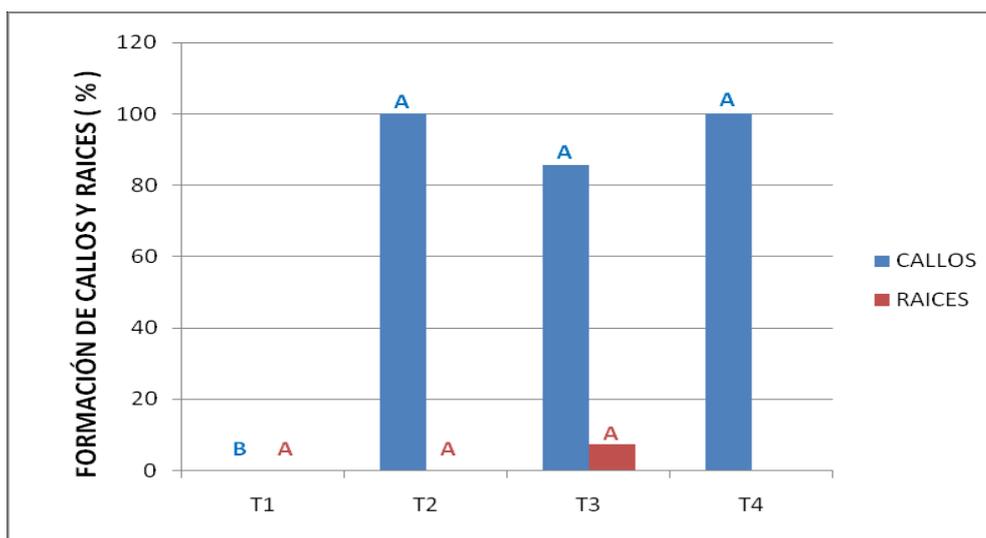


FIGURA 9 Formación de callos y raíces en explantes de peciolo en los medios de cultivo con diferentes concentraciones de 2,4-D. *Medias con letras diferentes difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según prueba de comparación de proporciones.*

En los peciolo, los callos aparecen como pequeñas protuberancias sobre la superficie del explante y en la parte donde se ha producido el corte (tejido de cicatrización) (Figura 10). El tamaño de los callos fue mayor a medida que se aumentó la concentración de 2,4-D, llegando a ocupar toda la superficie del explante cuando se utilizaron concentraciones de 1,0 y 2,0 mg/L de 2,4-D (Figura 10, T3 y T4). Los callos formados mostraron una coloración pardo claro con una consistencia esponjosa.

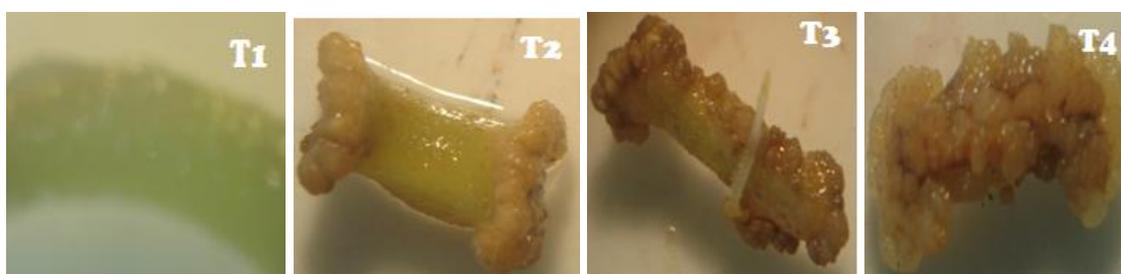


FIGURA 10. Formación de callos y raíces en explantes de peciolo a los 30 días en los diferentes tratamientos.

En estudios desarrollados por Vaca y Romero (2009), en el cultivo de la morera, informaron que al utilizar explantes de peciolo, la formación de los callos se inicio en las zonas de corte y en los laterales del explante, resultados que son similares a los obtenidos en la presente investigación; estos mismos

autores informan la formación de callos de un diámetro entre 3,5 a 6,2 mm, el cual varía en dependencia de la concentración de 2,4-D empleada.

Al evaluar a los 30 días los explantes de tallos, se observó la formación de callos en todos los tratamientos en los cuales se utilizó 2,4-D, alcanzándose valores del 100% de explantes con callos. El desarrollo de raíces, solo se observó en los tratamientos dos y tres, con valores de 15,38 y 7,69% respectivamente (Figura 11)

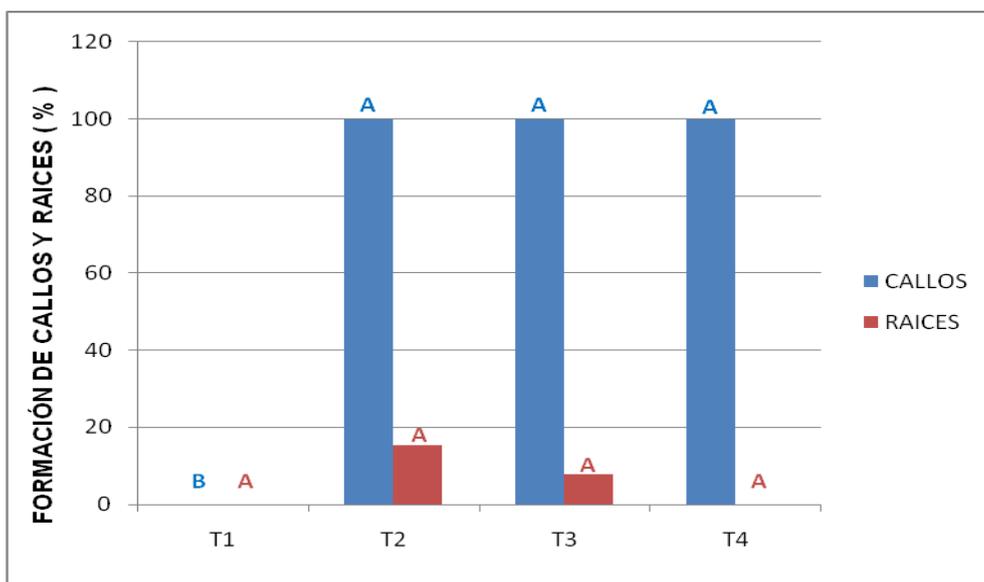


FIGURA 11 Formación de callos y raíces en explantes de tallos en los medios de cultivo con diferentes concentraciones de 2,4-D. *Medias con letras diferentes difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según prueba de comparación de proporciones.*

El desarrollo de los callos en los explantes de tallos ocurrió a partir del tejido de cicatrización, zona donde se produjo el corte. Los callos muestran un color pardo oscuro, son de tamaño pequeño en los tratamientos dos y tres, cuando se utiliza 2,0 mg/L de 2,4-D los callos formados alcanzan un mayor tamaño, cubriendo prácticamente todo el explante (Figura 12 T4). Las raíces formadas, son gruesas y largas, sin embargo el número de raíces por explantes es muy escasa (1 o 2 por explantes)

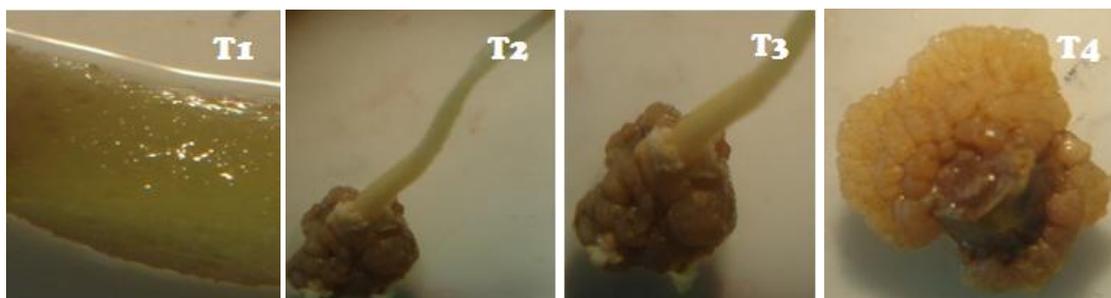


FIGURA 12. Formación de callos y raíces en explantes de tallos a los 30 días en los diferentes tratamientos.

En relación con la formación de callos a partir de explantes de tallos, Elias (2008), reporta solo el 1,96 % de explantes con callos resultados que no coinciden con los obtenidos en la presente investigación; este mismo autor informa que los callos formados son de color marron amarillento.

En correspondencia con los resultados obtenidos podemos afirmar que el empleo de hojas, peciolo y tallos, como explante en el cultivo de la morera, permiten la obtención de callos de forma eficiente, lográndose altos valores para cada uno de los tipos de explantes. Al analizar las características de los callos formados y el desarrollo a partir de ellos de órganos adventicios, resultan más adecuados los callos obtenidos a partir de los explantes de limbo foliar.

El empleo de 2,4-D en el medio de cultivo para la formación de callos en el cultivo de la morera resultó imprescindible. El uso de concentraciones de 2,4-D iguales o superiores a 0,5 mg/L, propicia la formación de callos en todos los tipos de explantes evaluados. Se pudo observar que a medida que fue aumentando la concentración de 2,4-D se incremento el tamaño de los callos formados.

Shu *et al.* (2005) obtuvieron los mejores resultados en la obtención de callos embriogénicos cuando utilizaron como explante tallos de *Dioscorea zingiberensis* e incluyeron en el medio de cultivo 0,5 mg/L BA y 2 mg/L de 2,4-D obteniendo una frecuencia de formación de callos de un 87%. González (1993), plantea que las diferencias en la respuesta de los explantes pueden deberse a variaciones en el contenido endógeno de hormonas y a las características anatómicas de los mismos. Por otra parte Suksa-Ard *et al.* (1999), consideran que la formación del callo depende considerablemente del órgano usado como explante.

Estudios realizados por Vaca y Romero (2009), les permitieron concluir que la formación de callos en el cultivo de la morera estuvo influenciada por el efecto de la concentración de los reguladores del crecimiento, por el grado de madurez y por la sensibilidad de los tejidos. Sanginés *et al.* (2002), lograron producir callos con buena apariencia al someter pecíolos, limbos y yemas axilares de *Morus alba* a tratamientos de 5 mg/L de BAP con 0,25 mg/L de 2,4-D.

Paneque (2006), al estudiar la respuesta a la callogénesis, de diferentes explantes de *Ipomoea batatas* L. evaluó tres tipos de explantes (limbos, pecíolos y entrenudos), añadiendo al medio de cultivo 2,4-D a 1 mg/L y 6-BAP a 0,50 mg/L, observó que en todos los casos el crecimiento de los callos comenzó en los bordes de los explantes (callo de cicatrización). Las características de los callos obtenidas a partir de los pecíolos fueron menos favorables, formándose callos de color amarillo, nodulares y compactos.

Según Gómez (1998), en los tejidos u órganos diferenciados y en presencia de una auxina y/o citoquinina en el medio de cultivo, se logra un proceso de desdiferenciación, mediante lo cual las células proliferan continuamente y de forma desorganizada en el explante apareciendo una masa amorfa. Jiménez (1998), considera que el abundante crecimiento de los callos puede deberse a que en condiciones de oscuridad no ocurre el efecto degradativo que provoca la luz sobre las auxinas, principalmente el 2,4-D y el AIA por un proceso oxidativo.

V. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron callos en el cultivo de la morera (100%) con el empleo de hojas, peciolo y tallo como explantes iniciales.
- Los callos formados a partir de hojas mostraron mejores características organogénicas.
- El empleo de concentraciones de 2,4-D iguales o superiores a 0,5 mg/L en el medio de cultivo, propicia la formación de callos en todos los tipos de explantes evaluados, (hojas 100%), (peciolo 100%), (tallos 100%) lográndose callos de mayor tamaño a medida que se incrementó la concentración de esta auxina.

VI RECOMENDACIONES

- Estudiar otras concentraciones de 2,4-D, para lograr callos con mejores características organogénicas.
- Evaluar la regeneración de los callos obtenidos a partir de los diferentes tipos de explantes y concentraciones de 2,4-D.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Agramonte, D; Peñalver, F y Dita, M (1998) Aclimatización En: Pérez, JN (Ed) Propagación y Mejora de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. p.193-205.
2. Almeida, J. E. y Fonseca, T. (2006). Mulberry Germplasm and Cultivation in Brasil www.fao.org/ag/AGA/AGA/FRG/Mulberry/Papers/HTML/Almeida1.htm obtenida el 9 Mar 2006 10:24:24 GMT.
3. Barbón, R. (2003). Aspecto relacionado con el ambiente físico y la caracterización molecular de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal* 3 (4): 211-221.
4. Barranco, LA. (2001). Embriogénesis somática en banano (*Musa* AAAB cv. FHIA-18) empleando medios de cultivo líquidos. En: Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas, Santa Clara .p.8-15.
5. Benavides, J; Lachaux, M; Fuentes, M. (1994). Efecto de la aplicación de estiércol de cabra en el suelo sobre la calidad y producción de biomasa de morera (*Morus sp.*) En: Árboles y arbustos forrajeros en América Central.
6. Benavides, JE. (1995). Manejo y utilización de la morera (*Morus alba L*) como forraje. *Agroforestería en las Américas*, II (7): 27-30.
7. Benavides, JE. (1999). Utilización de la morera en sistemas de producción animal. En: Sánchez, MD, Rosales, M Agroforestaría para la producción animal en Latinoamérica. Memorias de la Conferencia electrónica. FAO, Roma.
8. Cepeda, J. (1991). El árbol de oro. Los mil usos de la morera. *Medio Ambiente (Perú)* 47:28-29.
9. Chakraborty, SP; Biswas, CR; Vijayan, K; Roy, BN; Saratchandra, B. (2000). Evaluation of mulberry varieties for coastal saline soils of West Bengal. *Bulletin of Indian Academy of Sericulture*. 4: 2, 41-45.
10. Crozier, A. (1981). Aspects of metabolism and physiology of gibberellins *Adu. Bot .Res.* 9: 33-148.
11. Coello, M. (1998). Inducción de callos y embriones en diferentes clones de cacao (*Theobroma cacao*. L). En: Trabajo de Diploma. Fretr. p. 8-9.

12. Elías, Y; (2008). Establecimiento y formación de callos de *Morus alba* L. en condiciones *in vitro*. En: Trabajo de Diploma. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Universidad de Granma. Bayamo Cuba.
13. Espinosa E y Benavides, JE. (1998). Efecto del sitio y la fertilización nitrogenada sobre la producción y calidad de la morera (*Morus alba*) Livestock Res. Rural Dev., 10(2):<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd10/2/benav102.htm>.
14. FAO (1988). Mulberry cultivation. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO. N° 73/1. Roma. p.-127.
15. FAO (1990). Sericulture training manual. FAO Agricultural Services Bulletin 80, Rome. p. 117.
16. Fernández, AE (1935). El Cultivo de la morera. Revista de Agricultura. La Habana, Mayo 6, 1935. p-8.
17. Frank, M y Schmulling, T. (1999). Cytokinin cycles cells. Trends in Plant Sciences, 4 (7):243-244.
18. Fuentes, L; Mesa, AR; Ruiz, ML; Peláez, MI y Fernández, M. (2005). Estudio histológico en callos de *Stylosanthes guianensis*. Pastos y Forrajes, 28 (3): 199.
19. Gamboa, VA y Núñez, LE. (2001). Comportamiento de la propagación masiva del ñame en escala comercial .Trabajo de Diploma Universidad de Oriente.
20. Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L. (2004). Establecimiento de cultivo de tejidos. En: Biotecnología y Mejora Vegetal. (Ed): INTA, Parte II Herramientas Básicas. Buenos Aires, Argentina. 27-33.
21. González, MC; Morejón, R y Portilla, M. (2007). Establecimiento de las concentraciones óptimas de hormonas para el cultivo *in vitro* de especies de *Coffea arabica* L. XII Congreso Científico del INCA. Programas y Resúmenes.
22. González, S y Mejía, I. (1994). Utilización de la morera (*Morus indica*) como reemplazo parcial del concentrado en la crianza de terneras. Tesis de grado, Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia.
23. Govindan, R; Narayanaswamy, TK and Magadum, SB. (1988). Relative moisture loss from leaves of some mulberry varieties during storage. Current Research University of Agricultural sciences Bangalore 17(11):151-153.
24. Jiménez, E. (1998). Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez JN. (eds). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba .p. 45-46.

25. Lazcano, CJ; Alonso, O y Docazal, J. (2002). Comportamiento de *Cercospora mori* en cuatro variedades de morera, fertilizada con materia orgánica y sometida a defoliación. I Taller Internacional de morera (*Morus alba L*)
26. Lu, M. (2002). Micropropagation of *Morus latifolia* Poilet using axillary y buds from mature trees. *Scientia Horticulturae* 96:329-341.
27. Maceo, Y. (2007). Establecimiento y multiplicación *in vitro* de la *Curcuma longa*. En: Trabajo de Diploma. Centro de Estudio de Biotecnología Vegetal, Universidad de Granma. p. 9-10.
28. Machii, H. (1992). Organogenesis from immature leaf cultures in mulberry (*Morus alba L.*) *J.Seric.Sci.Jap.*61:512-519.
29. Machii, H; Koyama, A; Yamanouchi, H. (2000). FAO Electronic Conference: Mulberry for Animal Production. Available on <http://www.fao.org/livestock/agap//mulberry>. accessed on 28/06/02.
30. Martín, G; Yépez, I; Hernández, I y Benavides, JE. (1998). Evaluación del comportamiento de cuatro variedades de morera durante la fase de establecimiento. En: Memorias III Taller Silvopastoril "Los árboles y arbustos en la ganadería" EEPF "Indio Hatuey", Matanzas, Cuba. p- 92.
31. Medero, ML; Montoya, M; de la Osa, J. (1999). Uso de forraje de morera (*Morus alba L*) en la ceiba cunícula. En: I Taller Internacional de morera "La morera (*Morus alba L*) oportunidades y posibilidades de uso para la alimentación animal. EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba.
32. Medero, VR. (2006). Embriogénesis somática en yuca (*Manihot esculenta*, Crantz.) En: Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. p.100.
33. Milera, M; Martín G y Ojeda F. (2003). Potencial del forraje de morera para la alimentación del ganado. Estación Experimental de Pastos y Forraje. Indio Hatuey.
34. Murashige, T y Skoog, F. (1968). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473 - 497.
35. Ohyama, K (1970) Tissue culture in mulberry tree *Jap.agr.Res.quart.*5:30-34.
36. Orellana, P. (1998). Propagación vía organogénesis. En: Pérez, JN (ed.). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. p. 151-178.

37. Oviedo, FJ; Benavides, JE y Vallejo, M. (1994). Evaluación bioeconómica de un módulo agroforestal autosostenible con cabras lecheras en Tumulba, Costa Rica. En: JE Benavides (eds). "Árboles y arbustos forrajeros en América Central". Vol. II. No. 236. Turrialba, C.R. CATIE. p. 601-630.
38. Oviedo, F (1995) Morera (*Morus* sp.) en asociación con *Erythrina poeppigiana* y como suplemento para vacas lecheras en pastoreo. Tesis Mag. Sc, Turrialba C.R., CATIE. p.-87.
39. Paneque, O. (2006). Establecimiento de una metodología de micropropagación mediante la embriogénesis somática en el cultivo del boniato (*Ipomoea batatas* L.) En: Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas- Universidad de Granma.
40. Parrot, W. (1993). Cell culture techniques: cell-culture, *in vitro* selection and somaclonal variation. En: Biotechnology applications for banana and plantain improvement. Reunión INIBAP (1992, San José, Costa Rica) Proceeding. Montpellier, Francia. p.183-191.
41. Pelacho, A; Martín, L; Cueva, R; Sanfaliere, J; Badía, J y Alins G. (2002). Cultivo *in vitro* (en línea) En http://www.etsea.edl.es/in_vitro/luz (Consulta 12 julio 2005). Tissues of *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Scientia Agricola.58:759.
42. Pérez, J. (2006). Embriogénesis somática en frijol tepary (*Phaseolus acutifolius* A. Gray cv. TB1). En: Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Villa Clara. p. 15-18.
43. Pérez, JE y Gómez, R. (1998). Field performace (*Sacharum spp hybrids*) Mutantst. En: Somaclonal and induced mutation in crop improvement. SM jain D.S. Brar B.S. Ahloowalia (Eds) Dordrecht: Flower Academic Publishers. p. 425-448.
44. Puco, AL; Venegas, VI. (2010). Micropropagacion, formación y regeneración de callos en el cultivo del clavel (*Dianthus caryophyllus* L) var. Rojo español. Trabajo de diploma. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Universidad de Granma. Bayamo Cuba.
45. Quecini, VM y Vieira, ML. (2001). Transient gene expresion in electroporated intact tissues of *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Scientia Agricola. 58:759.
- Fuentes, L; Mesa, AR; Ruiz, ML; Peláez, MI y Fernández, M. (2005). Estudio histológico en callos de *Stylosanthes guianensis*. Pastos y Forrajes, 28 (3): 199.

46. Radice, S. (2004). Morfogénesis *in vitro*. Parte II Herramientas Básicas de la Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. En: Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L. (eds). Biotecnología y Mejora Vegetal. (Ed): INTA, Buenos Aires, Argentina.p. 27-33.
47. Roca, W; Mroginski (1993). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Editorial CIAT. Colombia No. 151. p. 60-70.
48. Rossel, C (1990). Fundamento teórico práctico del tejido vegetal.
49. Salas, BJ; Agramonte, PD; Barbón, RR; Jiménez, TF; Collado, LR; Pérez, PM; Gutiérrez, MO y Ramírez, AD. (2004). Establecimiento *in vitro* de morera. Biotecnología Vegetal 4 (2): 15-19.
50. Sánchez, MD. (1999). Mulberry: an exceptional forage available almost worldwide. World Animal Review 93(2):36-46.
51. Sánchez, MD. (2002). Mulberry: and exceptional forage available almost worldwide. En: Sánchez, MD (ed.). Mulberry for animal production. Animal Production and Health. Division. FAO. Roma. Paper 147, pp.161-172.
52. Sánchez, MD. (2006). Morera: un forraje excepcional disponible mundialmente. www.fao.org/ag/aga/agap/frg/afris/espanol/document/agrof99/sanchezm.htm obtenida el 6 Oct 2006 09:20:21 GMT.
53. Salas, BJE; Agramonte, PD; Barbón, RR; Jiménez, TF; Collado, LR; Pérez, PM; Gutiérrez, MO y Ramírez, AD (2004) Establecimiento *in vitro* de morera. Biotecnología Vegetal 4 (2): 15-19.
54. Sierra, M. (2006). Alimentación con morera (*Morus alba*). Foros de Cunicultura.Colombia.http://www.engormix.com/alimentacion_con_morera_morus_forums_view2055.htm.
55. Takahashi, T; Gasch A; Nishizawa, N y Chua, N. (1995). The diminuto gene of *Arabidopsis* is involved in regulating cell elongation. Genes and Development.9:97-107.
56. Thomas, TD. (2002). Advances in mulberry tissue culture. J. Plant Biol.45:7-2
57. Mesa, AR; Lajonchere, G; Prieto, M y Toral, O. (1993). Organogénesis en *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT 184. *Pastos y Forrajes*. 16:207.
58. Tikader, A; Roy, BN. (1999). Growth potential in different mulberry germplasm accessions (*Morus* Kspecies). Indian-Journal-of-Forestry 22: 362-365.
59. Toral, O; Simón, L y Matías, Y (2001). Caracterización de la morera en condiciones de arboretum. II Taller Internacional de morera (*Morus alba* L).

60. Trejo, G; Maldonado, U; Jiménez, A; Blanqueto, M; Salcedo, G; Martínez, P y De Jesús, A. (2002). Reguladores de crecimiento en la regeneración de plantas a partir de anteras de arroz (*Oriza sativa* L) var. Japónica H 2005). *Agrocien-*
cia.36:441-449.
61. Vaca, P y Romero, E. (2009). Propagación de la morera (*Morus alba* L.) mediante el cultivo de tejidos var. Acorazonada. Trabajo de diploma. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Universidad de Granma. Bayamo Cuba.
62. Vargas, S; Franco, R; Lago, CM; Padrón, Y; Suárez, D; Hernández, F; Hernández, C y Ricardo, S. (2002). Algunas observaciones agronómicas de cuatro variedades de morera (*Morus alba*) durante tres fases de establecimiento. (CD-ROOM). Memorias V Taller Internacional Silvopastoril “Los árboles y arbustos en la ganadería tropical” y II Reunión regional de Morera. EEPF “Indio Hatuey”. Matanzas, Cuba.
63. Vasil, IK. (1994). Automation in plant propagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39 (2):105-108.
64. Velásquez, M; Gutiérrez, M A; Aries, R y Rodríguez, C. (1992). El forraje de morera (*Morus alba* sp.) como suplemento en dietas de ensilado de sorgo. En: *Árboles y Arbustos Tropicales en América Central*.
65. Zayas, D. (2005). Efecto de diferentes formulaciones de vitamina en la multiplicación *in vitro* del ñame (*Dioscorea alata* L.). Trabajo de Diploma. p. 9 -11.
66. Ziv, M. (1999). Plant propagation and mechanized separation of organogenic clusters from bioreactor culture. En: Taller Internacional de Biotecnología (Bio Veg 99). CD-ROOM Bioplantas, Ciego de Ávila, Cuba.