

Caracterización morfo-agronómica de plantas "in vitro" de *Morus alba* L. variedad Criolla

Morpho-agronomic characterization of "in vitro" plant of *Morus alba* L. cv Criolla

José Enrique Salas^{1,2}, Daniel Agramonte², Felipe Jiménez-Terry² y Raúl Collado²

1. Colegio de Postgraduados. Campus Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco. México. Tel: 937 372 40 99. Fax: 937 372 22 97.
2. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830

E-mail: salasj@colpos.mx

RESUMEN. Se evaluaron en condiciones de campo plantas de morera cultivadas "in vitro" en medio de cultivo semisólido y sistemas de inmersión temporal. Como control se emplearon plantas derivadas de estacas. Se utilizó un diseño de clasificación simple con cuatro réplicas por tratamiento. Se determinaron como variables cuantitativas el número de plantas vivas (se calculó el porcentaje de supervivencia), longitud de la planta, número de hojas y ramas, área foliar y producción de biomasa foliar. Como variables cualitativas se incluyeron la forma, color, superficie, textura y margen de las hojas. Las plantas procedentes de los sistemas de inmersión temporal y medio de cultivo semisólido superaron en todas las variables cuantitativas evaluadas a las derivadas de estacas. No se observaron diferencias entre las plantas "in vitro" y las de estacas en cuanto a forma, color, superficie, textura y margen de las hojas. Se evidenciaron las ventajas que tiene la propagación *in vitro* en relación con la convencional expresadas principalmente en un mayor crecimiento y producción de biomasa.

Palabras clave: cultivo "in vitro", sistemas de inmersión temporal.

ABSTRACT. "In vitro" plants derived of semisolid culture medium and temporary immersion system compared with stakes derived plants were evaluated. A simple classification design with four replicates by treatment was used. As quantitative variable were evaluated percentage of survival, height of plant, number of leaves and branches, foliar area and biomass production and like quantitative variable were the shape, colour, surface, texture and margin of leaf. The immersion system and semisolid medium plants were superior to the stakes plants in all quantitative variables. The "in vitro" plants were similar to stakes plants in shape, colour, surface, texture and margin of leaf. The advantages of in vitro propagation liken conventional propagation were evidenced mainly expressed in a superior growth and biomass production.

Key words: "in vitro" culture, temporary immersion systems.

INTRODUCCIÓN

La morera, es una especie forrajera arbustiva con perspectivas de expansión a nivel mundial debido a sus elevados rendimientos en biomasa comestible, digestibilidad, palatabilidad, altos valores nutricionales, perennidad frente al corte, su uso como forraje verde, conservada en forma de ensilaje o deshidratada (Sánchez, 2002b). Su cultivo se inició hace 5 000 años con el objetivo de alimentar o cubrir los requerimientos nutricionales del gusano de seda (*Bombix mori* L.) y no fue hasta finales de los años 80 cuando se inició la investigación y su utilización como alimento animal en América Latina y el Caribe, debido a sus excelentes características como forraje (Datta, 2002; Machii *et al.*, 2002; Sánchez, 2002a; Yongkang, 2002).

La propagación de esta especie forrajera perenne es a través de estacas o de semilla, siendo un factor limitante para su expansión territorial (Benavides, 2002; Datta, 2002; Sánchez, 2002b; Yongkang, 2002; Henríquez, 2004). La propagación por semilla es indeseable y no recomendable debido a la heterogeneidad propia de las semillas como resultado de la polinización cruzada (Anis *et al.*, 2003; Gnanam, 2004).

El sistema convencional de propagación tiene como inconveniente que el material de plantación (tallos), es también utilizado para la alimentación animal, lo cual reduce aún más su disponibilidad. Por otra parte, la brotación y crecimiento de nuevos brotes

demanda un alto requerimiento nutricional por las plantas (Benavides, 2002; Martín et al., 2002; Singh y Makkar, 2002); este sistema tiene altos costos de mano de obra y lento desarrollo de las plantas (Bhau y Wakhlu, 2001; Lu, 2002).

Alternativamente, la propagación “in vitro” de plantas, es un método más rápido para la producción de grandes cantidades de plantas homogéneas en un período de tiempo relativamente corto y durante todo el año. El cultivo “in vitro” asegura la propagación de la especie vegetal todo el año con altas tasas de multiplicación y puede ser utilizada en la producción a gran escala a nivel comercial (Vijayan y Padmaja, 2002; Anis et al., 2003; Hassanein et al., 2003; Gnanam, 2004).

Se han realizado varios estudios para la propagación “in vitro” de plantas en el género *Morus* (Balakrishnan et al., 2009; Prasada et al., 2010) así como en *Morus alba* L. variedad Criolla (Salas et al., 2004; Salas et al., 2005). Sin embargo, las características en campo de las plantas obtenidas por cultivo “in vitro” no se conocen.

La necesidad urgente de un alimento animal de alta calidad, la existencia de protocolos para su propagación masiva y las características como planta forrajera, hacen de la morera una especie de gran importancia tanto para la investigación como para la producción. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar las características morfo-agronómicas de las plantas obtenidas por cultivo “in vitro” de *Morus alba* L. variedad Criolla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron plantas obtenidas por cultivo de tejidos en medio de cultivo semisólido (SS) y en sistemas de inmersión temporal (SIT), obtenidas según la metodología empleada para la propagación “in vitro” de especies vegetales (Orellana, 1998). Todas las cuales permanecieron 45 días en casa de cultivo para su aclimatización. Después de esta fase, fueron trasplantadas en un suelo pardo sialítico mullido (Hernández et al., 2003), 600 plantas por procedencia con una altura promedio de 30 cm y nueve hojas activas como mínimo. Además, se incluyeron como control (E) plantas originadas del establecimiento de estacas de morera (Sanginés et al., 1999) que poseían similares características al momento de la plantación.

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con cuatro réplicas por tratamiento. Se realizaron tres evaluaciones a los 4, 8 y 12 meses para las variables cuantitativas y una a los 12 meses para las variables cualitativas, las cuales fueron determinadas de acuerdo con la descripción y caracterización de la morera (*Morus* spp.) a nivel mundial (Sohn, 2003).

Se consideraron como principales variables cuantitativas a evaluar (Machii et al., 2000; Sohn, 2003):

- número de plantas vivas (se calculó el porcentaje de Supervivencia tomando en cuenta la relación entre el número total de plantas sembradas y el número de plantas vivas al hacer la evaluación, la cual se llevó a cabo a los 30 días de realizada la plantación en campo de acuerdo con Sanginés et al., (1999) y Toral et al., (1999).

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

- Determinación del número de hojas y ramas. Para estas variables se seleccionaron 10 plantas por réplica a las cuales se les contabilizó el número de hojas y ramas.

- Área foliar (cm²). Para determinar esta variable se consideraron cinco hojas de la parte apical, media y basal de cinco plantas por réplica y el área total se calculó del número total de hojas evaluadas al considerar el largo (cm), ancho (cm) de cada hoja y el factor de ajuste 0.7.

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

De acuerdo con las características de importancia de la morera como lo son producción de biomasa y calidad del follaje, las principales variables cualitativas evaluadas para caracterizar esta especie fueron (Machii et al., 2000; Sohn, 2003):

- Forma de la hoja. Determinada a partir de la relación entre el largo y ancho de la hoja y clasificada como

Lanceolada: 3:1, Escasamente ovada: 2:1, Ovada: 1.5:1, Ampliamente ovada: 1.2:1 y Cordiforme: 1:1.

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

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

- Textura de la hoja. Determinada al tomar la hoja completa y de acuerdo con su textura: Membranosa: hojas delgadas y semitransparentes, Caratácea: hojas opacas como el papel, Cariácea: hojas gruesas y duras.

- Margen de la hoja. Determinado visualmente y clasificado como dentado, aserrado u ondulado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

La evaluación en condiciones de campo de las plantas obtenidas a través del cultivo “*in vitro*” permitió conocer su crecimiento y desarrollo bajo estas condiciones y compararlo cuantitativa y cualitativamente con respecto a las propagadas por estacas. De acuerdo con los resultados de este estudio en las variables cuantitativas, el método de propagación de las plantas influyó significativamente sobre la longitud de la planta, el número de hojas, el número de ramas, el área foliar y la producción de biomasa foliar en condiciones de campo.

El análisis de estas variables indicó que en todos los casos las plantas procedentes de los SIT y SS superaron en todas las evaluaciones a las obtenidas mediante estacas, lo que demostró el efecto del cultivo de tejidos vegetales “*per se*”. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre las plantas obtenidas de medio de cultivo semisólido y las de inmersión temporal. Estos resultados evidenciaron las ventajas que tiene la

propagación “*in vitro*” en relación con la convencional expresadas principalmente en un mayor crecimiento y producción de biomasa (Tabla 1).

En la variable supervivencia no se observaron diferencias significativas entre las plantas procedentes de medio de cultivo semisólido y las de inmersión temporal, lo que indicó que el estado físico del medio de cultivo donde se desarrollaron las plantas “*in vitro*” no afectó la supervivencia de estas en la fase de campo. Asimismo, no se observaron diferencias entre plantas “*in vitro*” respecto a las plantas derivadas de estacas.

Los valores obtenidos para esta variable fueron de 97,5, 98,5 y 97,0% para las plantas cultivadas en medio de cultivo SS, SIT y E, respectivamente; lo cual indicó que las condiciones de cultivo donde se desarrollaron las plantas permitieron disminuir al máximo posible las pérdidas de material vegetal y en el proceso de aclimatización previo se lograron plantas morfológicamente aptas para su establecimiento en condiciones de campo. No obstante, en la supervivencia de las plantas procedentes del cultivo “*in vitro*” en condiciones ambientales, influyen varios factores entre los más importantes se encuentran el desarrollo y crecimiento alcanzado en la casa de cultivo, el manejo de las plantas al momento de la plantación, labores culturales postplantación (riego, fertilización), etc.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Sanguinés *et al.*, (1999), Toral *et al.*, (1999) y Benavides, (2002) quienes mencionaron valores de 98 a 100% de supervivencia en estacas de morera sembradas en campo. Sin embargo, Domínguez *et al.*, (2001) indicaron un valor inferior (60.2%) que atribuyeron a las condiciones edafoclimáticas que prevalecieron durante el desarrollo del experimento.

Varios autores coinciden con los resultados obtenidos al evaluar en condiciones de campo plantas “*in vitro*” de otras especies leñosas y señalaron un crecimiento más vigoroso de la longitud de las plantas, más hojas por planta y mayor producción de biomasa, respecto a las obtenidas mediante la propagación convencional (Zebrowska *et al.*, 2003; Litwinczuk, 2004; Agostini y Echeverringaray, 2006; Maximova *et al.*, 2008), lo que indicó una mayor velocidad de crecimiento de las plantas y consecuentemente se puede obtener mayor cantidad de estacas o material vegetal para propagación y mayor producción de biomasa.

Tabla 1. Variables cuantitativas evaluadas en las plantas “*in vitro*” de *Morus alba* L. variedad Criolla en condiciones de campo a los 4, 8 y 12 meses de plantadas

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

a, b. Medias con letra distinta en la misma columna difieren para $p < 0.05$ de acuerdo con Tukey

SS: Medio de cultivo semisólido. SIT: Sistemas de inmersión temporal. E: Estacas. EE: Error estándar.

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

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

Por otro lado, la propagación “*in vitro*” a través de la organogénesis directa (yemas axilares) es un método eficiente de regeneración para obtener plantas libres de enfermedades, con mayor estabilidad genética, uniformes y cantidades elevadas del material vegetal (Jiménez, 1998a; Pérez, 1998; Honda *et al.*, 2001).

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

En relación con el número de ramas por planta, los mejores resultados se observaron en las plantas procedentes del cultivo “*in vitro*” con valores de 20,9 y 22,1 para las cultivadas en medio de cultivo semisólido

e inmersión temporal, respectivamente, los cuales fueron tres veces superiores a los obtenidos en las plantas procedentes de estacas (6,7). Al mismo tiempo, pueden ser utilizadas como material de plantación. Sin embargo, otros autores como Martín *et al.*, (2000), Domínguez *et al.*, (2001) y Benavides, (2002) señalaron valores inferiores en relación con los encontrados en este estudio en las plantas procedentes de estacas. Este resultado puede ser debido a que estas plantas iniciaron su crecimiento bajo condiciones controladas de casa de cultivo previo a su trasplante en campo, lo que garantizó un desarrollo más sano y vigoroso en esta fase y por consiguiente un crecimiento más rápido en el campo.

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

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

Los valores obtenidos para la variable biomasa foliar fueron inferiores a los indicados por Martín *et al.*, (2002) en plantas de *Morus alba* L., quienes mencionaron una producción de biomasa de 645 g.planta⁻¹.año⁻¹. Esto se debió a que los autores incluyeron en esta variable el pecíolo, la hoja y tallos tiernos, y en éste experimento sólo se usaron las hojas. Al respecto, Benavides (2002), Sánchez (2002b) y Ye (2002) mencionaron que la producción de biomasa foliar en morera estuvo influenciada por varios factores como el número de hojas, variedad, localidad, edad de la planta, tipo de suelo, método de propagación y densidad de siembra. Estos autores señalaron que cuando el objetivo es la

producción de biomasa se pueden plantar desde 20 hasta 50 mil plantas por hectárea. Sin embargo, Ye, (2002) y Noda y Martín, (2008) recomendaron la densidad de 25 mil para obtener plantas de buena composición bromatológica tomando en cuenta la competencia que ejercen las plantas por el espacio, la luz y los nutrientes.

Para las variables cuantitativas no hubo diferencias significativas entre las plantas procedentes del cultivo “*in vitro*”, por lo tanto las diferencias con respecto a las plantas obtenidas por el método convencional de propagación, están determinadas por aspectos fisiológicos relacionados con el rejuvenecimiento del material vegetal. Las plantas “*in vitro*” tienen un mayor potencial de producción de biomasa por lo que están fisiológicamente más jóvenes y tienen un desarrollo en campo superior respecto a las propagadas por estacas.

Estos resultados, observados sobre todo en las plantas procedentes del cultivo “*in vitro*”, en *Morus alba* L. variedad Criolla, son importantes para conocer su dinámica de crecimiento y desarrollo, ya que se tiene muy poca experiencia en este tipo de plantación. Además, propician el establecer algunas estrategias que permitan una mayor efectividad en su explotación en condiciones de producción.

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

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

Los caracteres cualitativos evaluados en este experimento no mostraron diferencias en las variables analizadas y coincidieron con las características de las

plantas de *Morus alba* L. variedad Criolla empleadas como controles (propagadas por estacas), estas fueron: forma de la hoja ovada, el color fue verde oscuro, con la superficie lisa, textura membranosa y el margen ondulado. Además, se observó una mayor uniformidad de las plantas “in vitro” respecto a las procedentes de estacas.

De acuerdo con Machii et al., (2000) y Sohn (2003) los caracteres cualitativos evaluados en las diferentes especies del género *Morus* se basan principalmente en las características de las hojas, las cuales determinan las diferencias entre ellas. Por otro lado, las hojas son el principal objeto de estudio en las diferentes investigaciones realizadas a nivel mundial, debido a que es el principal alimento del gusano de seda (*Bombix mori* L.) y para el cual están enfocados los estudios llevados a cabo en la evaluación de diversos métodos de propagación, mejoramiento genético, aspectos agronómicos y de rendimiento, descripción y caracterización varietal, entre otros, al emplear tanto las técnicas convencionales de cultivo como las biotecnológicas (Lu 2002; Vijayan y Padmaja, 2002; Anis et al., 2003; Habib et al., 2003; Hassanein et al., 2003; Koyuncu, 2004; Umate et al., 2005).

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

CONCLUSIONES

Se determinaron las características morfo-agronómicas de las plantas obtenidas por cultivo “in vitro” de *Morus alba* variedad Criolla, en las que se logró un mejor crecimiento y desarrollo respecto a las plantas propagadas por estacas basado en una mayor altura de la planta, mayor cantidad de hojas y ramas así como mayor producción de biomasa foliar; por otro lado no se observaron diferencias entre los diferentes métodos de propagación de en cuanto a la forma, color, superficie, textura y margen de las hojas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agostini, G. y S. Echeverringaray.: Micropropagation of *Cunila incisa* Benth. A potential source of 1,8-cineole, Revista Brasileira

de Plantas Medicinales, Botucatu. 8: 186-189, 2006.

2. Almeida, J.E. y T. Canto: Mulberry germoplasm and cultivation in Brazil. In: Sánchez, M.D. (ed.). Mulberry for Animal Production. FAO Animal Production and Health Paper 147, Rome, pp. 73-95, 2002.

3. Anis, M; M. Faisal y S.K. Singh: Micropropagation of mulberry (*Morus alba* L.) through in vitro culture of shoot tip and nodal explants, Plant Tissue Culture: 13(1): 47-51, 2003.

4. Balakrishnan, V.; M. Ram Latha, K.C. Ravindran y J. Philip Robinson: Clonal propagation of *Morus alba* L. through nodal and axillary bud explants. Botany Research International, 2(1): 42-49, 2009.

5. Benavides, J.E.: Utilization of mulberry in animal production systems. In: Sánchez, M.D. (ed.) 2002. Mulberry for Animal Production. FAO Animal Production and Health Paper 147, Roma, pp. 301-340, 2002.

6. Bhau, B.S. and A.K. Wakhlu: Effect of genotype, explant type and growth regulators on organogenesis in *Morus alba*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 66: 25-29, 2001.

7. Bricoli Bati, C.; G. Godino, D. Monardo y V. Nuzzo: Influence of propagation techniques on growth and yield of olive trees cultivars Carolea and Nocellara Etnea, Scientia Horticulturae, 109: 173-182, 2006.

8. Datta, R. K.: Mulberry cultivation and utilization in India. In: Sánchez, M.D. (ed.). Mulberry for Animal Production. FAO Animal Production and Health Paper 147, Rome, pp. 45-60, 2002.

9. Domínguez, A.; E. Telles y J. Revilla: Comportamiento inicial de dos especies de morera en fase de establecimiento, Pastos y Forrajes, 24: 203-208, 2001.

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

11. Gómez, K.R.; L.A. Barranco, C. Villalobos, J. Sandoval, B. Chong, D. Daniels y M. Reyes. 2002. Estudio en campo de la estabilidad genética y el efecto del cultivo in vitro sobre los componentes de rendimiento de plantas regeneradas vía embriogénesis

- somática en medios de cultivo líquidos. En: Acrobat. XV Reunión. Medellín. Colombia. Pp. 59-67.
12. Habib, A.; M.R. Ali; M.N. Amin and M.M. Arman. 2003. Clonal propagation of white mulberry (*Morus alba* L.) using *in vitro* technique. Journal of Biotechnological Sciences. 3(12): 1181-1187.
13. Harizanis, P.C. 2007. Manual of Sericulture. Silkworm rearing. Mulberry cultivation. Agricultural university of Athens. Athens. 22 p.
14. Hassanein, A.M.; A.A. Galal y M.M. Azooz. 2003. Interaction between time of nodal explant collection and growth regulators determines the efficiency of *Morus alba* L. micropropagation. Journal of Plant Biotechnology. 5(4): 225-231.
15. Henríquez, M.E.A. 2004. Evaluación de tres factores de enraizamiento en estacas de morera (*Morus alba* L.). Memoria para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. 77 p.
16. Hernández, A.; M. Ascanio, A. Cabrera, M. Morales, N. Medina y R. Rivero. 2003. Nuevos aportes de la clasificación genética de los suelos en el ámbito nacional e internacional. Instituto de Suelos. Ministerio de la Agricultura. AGRINFOR. Ciudad Habana. Cuba.
17. Honda, H.; Ch. Liu y T. Kobayashi. 2001. large-scale plant micropropagation. En: Advances in biochemical engineering biotechnology. Zhong, J. (ed.). Springer Verlag Berlin Heidelberg. New York. 72: 157-182.
18. Jiménez, E. 1998a. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez, J.N. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara. pp. 13-24.
19. Koyuncu, F. 2004. Morphological and agronomical characterization of native black mulberry (*Morus nigra* L.) in Sütcüler, Turkey. FAO. International Plant Genetic Resources Institute. PGR Newsletter. 138: 32-35.
20. Leva, A. 2009. Morphological evaluation of olive plants propagated *in vitro* culture through axillary buds and somatic embryogenesis methods. African Journal of Plant Science. 3(3)37-43.
21. Litwinczuk, W. 2004. Field performance of "Sanga sangana" strawberry plants (*Fragaria x ananassa* Duch.) obtained by runner and *in vitro* through axillary and adventitious shoots. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. Series Horticulture. 7(1)
22. Lu, M.Ch. 2002. Micropropagation of *Morus latifolia* Poilet using axillary buds from mature trees. Scientia Horticulturae. 96: 329-341.
23. Machii, H., A. Koyama, H. Yamanouchi, K. Matsumoto, S. Kobayashi y K. Katagiri. 2000. A list of morphological and agronomical traits of mulberry genetic resources. Misc. Publ. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci. 29: 1-307. (In English).
24. Machii, H., A., Koyama y H. Yamanouchi. 2002. Mulberry Breeding, Cultivation and utilization in Japan. In: Sánchez, M. D. (ed.). Mulberry for Animal Production. FAO Animal Production and Health Paper 147. Rome, pp. 63-71.
25. Martin, G.; F. Reyes; I. Hernández y M. Milera. 2000. Estudios agronómicos realizados en *Morus alba* L. III Taller Internacional Silvopastoril "Los Arboles y Arbustos en la Ganadería". Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey". FAO. Matanzas. Cuba. pp. 200-204.
26. Martin, G.; F. Reyes; I. Hernandez and M. Milera. 2002. Agronomic studies with mulberry in Cuba. In: Sánchez, M. D. (ed.). Mulberry for Animal Production. FAO Animal Production and Health Paper 147. Rome, pp. 103-113.
27. Maximova, S.N.; A. Young, S. Pishak y M.J. Guiltinan. 2008. Field performance of *Theobroma cacao* L. plants propagated via somatic embryogenesis. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 44: 487-493.
28. Noda, Y. y G. Martin. 2008. Efecto de la densidad de siembra en el establecimiento de morera para su inclusión en sistemas ganaderos. Zootecnia Tropical. 26(3): 339-341.
29. Olmos, S.; G. Lusiani y E. Galdeano. 2004. Micropropagación. En: V. Echenique, C. Rubinstein y L. Mroginski (eds.). Biotecnología y mejoramiento vegetal. Parte V: Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Editorial INTA. Buenos Aires, Argentina. pp. 163-172.
30. Orellana, P. 1998. Propagación vía organogénesis. En: Pérez, N.J. (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara. Cuba. pp. 151-178.

31. Pérez, J.N. 1998. Variación somaclonal. En: Pérez, N.J. (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara. Cuba. pp. 105-121.
32. Pescio, F.; H. Zunini, C.P. Basso, M.D. de Sesar, R.G. Frank, A.E. Pelicano y C.M. Vieites. 2006. Sericicultura. Manual para la producción. Capítulo 3: Cultivo de la morera. Instituto Nacional de Tecnología Industrial. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. Argentina. pp. 37-64.
33. Prasada, J. S. V. N. H.; D. Nuthan y K.S. Krishna. 2010. A protocol for in vitro regeneration of rainfed mulberry varieties through callus phase. *Electronical Journal of Biotechnological Science*. 2(1): 80-86
34. Salas, J.E.; D.Agramonte; R. Barbón; F. Jiménez; R. Collado; M. Pérez; O. Gutiérrez y D. Ramírez. 2004. Establecimiento “in vitro” de morera. *Biología Vegetal*. 4(1): 15-19.
35. Salas, J.E.; D.Agramonte; R. Barbón; F. Jiménez; R. Collado; M. Pérez; O. Gutiérrez y D. Ramírez. 2005. Propagación “in vitro” de *Morus alba* L. en medio de cultivo semisólido. *Biología Vegetal*. 5(2): 81-87.
36. Salvi, N.D.; L. George y S. Eapen. 2002. Micropropagation and field evaluation of micropropagated plant of tumeric. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 68(2): 143-151.
37. Sánchez, M.D. 2002a. World distribution and utilization of mulberry and its potential for animal feeding. In: Sánchez, M. D. (ed.) 2002. *Mulberry for Animal Production*. FAO Animal Production and Health Paper 147. Rome, pp. 4-10.
38. Sánchez, M.D. 2002b. Mulberry: an exceptional forage available almost worldwide. In: Sánchez M. D., (ed.) (2002). *Mulberry for Animal Production*. FAO Animal Production and Health Paper 147. Rome, pp. 301-313.
39. Sanginés, G.J.R.; L.P.E. Lara; L.J.A. Rivera; L.L. Pinzón; T.O. Ramos; J. Murillo; M. Itra; C.C. Fuentes y G. Azcorra. 1999. Avances en los programas de investigación en morera (*Morus alba* L.) en Yucatán. I Congreso Internacional sobre Morera. Estación Experimental de Patos y Forrajes “Indio Hatuey”. Matanzas. Cuba.
40. Singh, B. and H.P.S. Makkar. 2002. The potential of mulberry foliage as a feed supplement in India. In: Sánchez, M. D. (ed.) 2002. *Mulberry for Animal Production*. FAO Animal Production and Health Paper 147. Rome, pp.131-140.
41. Sohn, K.W. 2003. Conservation status of sericulture germplasm resources in the world. I. Conservation status of mulberry (*Morus* spp.) genetic resources in the world. From papers contributed to expert consultation on promotion of global exchange of sericulture germplasm. FAO. Bangkok, Thailand. 197 p.
42. Toral, O.; L. Simón y Y. Matías. 1999. Caracterización de la morera en condiciones de *arboretum*. I Congreso Internacional sobre Morera. Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”. Matanzas. Cuba.
43. Umate, P.; K. Rao, K. Kiranmayee, T. Sree y A. Sadanandam. 2005. Plant regeneration of mulberry (*Morus indica* L.) from mesophyll-derived protoplasts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 82(3): 289-293.
44. Vijayan, K. y G. Padmaja. 2002. Seasonal influence on axillary bud sprouting and micropropagation of elite cultivars of mulberry. *Scientia Horticulturae*. 92: 55-68.
45. Ye, Z. 2002. Factors influencing mulberry leaf yield. In: Sánchez, M. D. (ed.). *Mulberry for Animal Production*. FAO Animal Production and Health Paper 147. Rome, pp. 124-125.
46. Yonkang, H. 2002. Mulberry Cultivation and Utilization in China. In: Sánchez, M. D. (ed.). *Mulberry for Animal Production*. FAO Animal Production and Health Paper 147. Rome, pp. 11-43.
47. Yungen, M. 2003. Conservation status of mulberry genetic resources in China. En: Sohn, K.W. (ed.). Conservation status of sericulture germplasm resources in the world. I. Conservation status of mulberry (*Morus* spp.) genetic resources in the world. From papers contributed to expert consultation on promotion of global exchange of sericulture germplasm. FAO. Bangkok, Thailand. pp. 47-78.
48. Zebrowska, J.I.; J. Czernas, J. Gawronski y J.A. Hortynski. 2003. Suitability of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) microplants to the field cultivation. *Food, Agriculture and Environment*. 1(3-4): 190-193.

Recibido: 17/09/2009

Aceptado: 11/12/2009