

DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA PROPAGACIÓN *in vitro* DE DOS  
VARIEDADES DE MORERA (*Morus alba* L.): TAIG SONG Y KANVA 2

Julián David Trochez Solarte  
Rosa Angélica Víquez Pancho

Universidad del Cauca  
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación  
Departamento de Biología  
Popayán  
2016

DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA PROPAGACIÓN *in vitro* DE DOS  
VARIEDADES DE MORERA (*Morus alba* L.): TAIG SONG Y KANVA 2

Julián David Trochez Solarte  
Rosa Angélica Víquez Pancho

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo

Directora:

Bióloga, M.Sc., Ph.D. Martha I. Almanza P.

Universidad del Cauca

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación

Departamento de Biología

Popayán

2016

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

**DIRECTOR** \_\_\_\_\_

**Ph.D. MARTHA I. ALMANZA**

**JURADO** \_\_\_\_\_

**M.Sc. OSCAR DARIO BERMUDEZ**

**JURADO** \_\_\_\_\_

**M.Sc. CLARA INÉS GIRALDO**

**Popayán, 16 de Febrero de 2016**

## TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS .....	6
LISTA DE FIGURAS .....	7
LISTA DE ANEXOS .....	8
AGRADECIMIENTOS .....	9
RESUMEN .....	10
INTRODUCCIÓN .....	11
1. JUSTIFICACIÓN .....	13
2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO .....	15
2.1. LA SERICULTURA .....	15
2.2. LA MORERA .....	16
2.2.1. Origen y distribución .....	16
2.2.2. Biología .....	16
2.2.3. Agronomía .....	16
2.3. ASPECTOS GENERALES PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO <i>in vitro</i> DE MORERA .....	18
2.3.1. El explante .....	18
2.3.2. Asepsia .....	18
2.3.3. Medios de cultivo .....	19
2.3.4. Condiciones ambientales del cultivo <i>in vitro</i> .....	21
2.4. PROPAGACIÓN POR CULTIVO <i>in vitro</i> DE TEJIDOS VEGETALES .....	21
2.4.1. Propagación en <i>Morus indica</i> L. ....	22
2.4.2. Propagación en <i>Morus australis</i> Poir. ....	26
3. OBJETIVOS .....	27
3.1. GENERAL .....	27
3.2. ESPECÍFICOS .....	27
4. METODOLOGÍA .....	28

4.1.	SELECCIÓN DE LA FUENTE DE MATERIAL VEGETAL .....	28
4.1.1.	Selección de los cultivos de morera .....	28
4.1.2.	Descripción botánica de los cultivares .....	29
4.1.3.	Selección de las plantas donadoras.....	30
4.1.4.	Evaluación de la brotación de yemas en condiciones de ambientales controladas.....	31
4.2.	DESINFECCIÓN.....	33
4.2.1.	Desinfección de segmentos nodales provenientes de campo.....	33
4.2.2.	Desinfección de segmentos nodales provenientes de brotes desarrollados en condiciones ambientales controladas. ....	34
4.3.	ESTABLECIMIENTO .....	35
4.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DISEÑO EXPERIMENTAL .....	36
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
5.1.	SELECCIÓN DE LA FUENTE DE MATERIAL VEGETAL .....	37
5.1.1.	Selección de los cultivos de morera.....	37
5.1.2.	Descripción botánica de los cultivares .....	37
5.1.3.	Selección de las plantas donadoras.....	42
5.1.4.	Evaluación de la brotación de yemas en condiciones ambientales controladas.....	43
5.2.	DESINFECCIÓN.....	47
5.2.1.	Segmentos nodales de <i>M. alba</i> cultivar Kanva 2 provenientes de campo .....	47
5.2.2.	Segmentos nodales provenientes de brotes en condiciones ambientales controladas.....	52
5.3.	ESTABLECIMIENTO .....	55
6.	CONCLUSIONES.....	58
7.	RECOMENDACIONES .....	60
8.	LITERATURA CITADA.....	62
	ANEXOS.....	71

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Medios de cultivo y fitorreguladores empleados para la propagación <i>in vitro</i> de cultivares de <i>Morus indica</i> L.....	23
Tabla 2. Ubicación de los cultivos de <i>M. alba</i> cultivar Kanva 2 y <i>M. australis</i> cultivar Taig song, pre-seleccionadas como fuente del material vegetal.....	29
Tabla 3. Tratamientos aplicados para la desinfección de segmentos nodales de <i>M. alba</i> cultivar Kanva 2 provenientes de campo. ....	34
Tabla 4. Tratamientos aplicados para la desinfección de segmentos nodales no lignificados de <i>M. alba</i> cultivar Kanva 2. ....	35
Tabla 5. Criterios para la selección de los cultivos de <i>M. alba</i> cultivar Kanva 2 y <i>M. australis</i> cultivar Taig song como fuente de material vegetal para cultivo <i>in vitro</i> . ....	38
Tabla 6. Características morfológicas de <i>M. alba</i> cultivar Kanva 2 y <i>M. australis</i> cultivar Taig song.....	39
Tabla 7. Resultados de la prueba de rangos de Kruskal-Wallis para determinar la influencia de la posición de la estaca sobre cuatro variables evaluadas en brotes de <i>M. alba</i> cultivar Kanva 2 desarrollados en condiciones ambientales controladas. ....	44
Tabla 8. Influencia de la posición de la estaca en la rama sobre cuatro variables evaluadas en brotes de <i>M. alba</i> cultivar Kanva 2, transcurridos 21 días de desarrollo en condiciones ambientales controladas.....	45
Tabla 9. Efecto de los tratamientos aplicados para la desinfección de segmentos nodales de <i>M. alba</i> cultivar Kanva 2 provenientes de campo. ....	48
Tabla 10. Efecto de los tratamientos aplicados para la desinfección de segmentos nodales, obtenidos de brotes de <i>M. alba</i> cultivar Kanva 2 en condiciones ambientales controladas. ....	53

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cultivo de <i>M. alba</i> cultivar Kanva 2 ubicado en la finca sericultora La Aurora. ....	28
Figura 2. Plantas de morera en campo: a) <i>M. alba</i> Cultivar Kanva 2, finca La Aurora. b) <i>M. australis</i> Cultivar Taig song, finca La Isabela. ....	31
Figura 3. Estacas de <i>M. alba</i> cultivar Kanva 2 en proceso de brotación en condiciones ambientales controladas. ....	32
Figura 4. Explantes de morera provenientes de campo: a) Segmento nodal de <i>M. alba</i> cultivar Kanva 2. b) Segmento nodal de <i>M. australis</i> cultivar Taig song. ...	33
Figura 5. Brotes de morera con tres (3) semanas de desarrollo en condiciones ambientales controladas: a) Brotes de <i>M. alba</i> cultivar Kanva 2. b) Brotes de <i>M. australis</i> cultivar Taig song. ....	35
Figura 6. Características morfológicas de los cultivares de morera. <b><i>M. alba</i> cultivar Kanva 2</b> : a) inflorescencia, b) flor femenina, c) flor perfecta, d) infrutescencia, e) fruto, f) pubescencia abaxial en la axila de la nervadura de la hoja, g) hoja entera, h) yema axilar; <b><i>M. australis</i> cultivar Taig song</b> : i) inflorescencia, j) flor masculina, k) pubescencia abaxial ausente en axila de la nervadura de la hojas, l) hoja lobulada, m) yema axilar con inclinación lateral. ....	40
Figura 7. Segmentos nodales no lignificados de <i>M. alba</i> cultivar Kanva 2 en diferentes estados de desarrollo en medio de cultivo MS suplementado con 0,25 mg/L de BAP. A) Día 5, brotación de yemas. B) Día 12, desarrollo de hojas. C) Día 30, subcultivo de brotes. ....	55
Figura 8. Formación de callo en plántulas de <i>M. alba</i> cultivar Kanva 2: a) Inicio de la formación de callo. b) Plántula invadida por el callo. ....	56
Figura 9. Segmentos nodales no lignificados de <i>M. alba</i> cultivar cultivar Kanva 2 en medio de cultivo MS suplementado con 0,15 mg/L de BAP. ....	56
Figura 10. Vástagos de <i>M. alba</i> cultivar Kanva 2 enraizados en medio MS con 0,15 mg/L de BAP y condiciones de baja luminosidad. ....	57
Figura 11. Segmentos nodales no lignificados de <i>M. autralis</i> cultivar Taig song en diferentes estados de desarrollo en medio de cultivo MS suplementado con 0,25 mg/L de BAP: A) Formación de brotes múltiples. B) Desarrollo de hojas. C) Vástago con 30 días en desarrollo. ....	57

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Características de los brotes según la posición de la estaca en las ramas de <i>M. alba</i> cultivar Kanva 2, desarrollados en condiciones ambientales controladas. Los datos se proporcionan en términos de la media $\pm$ el error estándar.....	71
Anexo 2. Características morfológicas de <i>M. alba</i> cultivar Kanva 2.....	72
Anexo 3. Características morfológicas de <i>M. australis</i> cultivar Taig song.....	73



## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios y a nuestras familias por el apoyo moral durante nuestra carrera y el desarrollo de nuestro trabajo de grado.

Agradecemos a nuestra Directora, la Ph.D. Martha I. Almanza; y a los jurados, M.Sc. Oscar Darío Bermúdez y M.Sc. Clara Inés Giraldo por el acompañamiento, las asesorías, la paciencia y sobre todo por la amistad que nos han brindado.

Agradecemos a la Facultad de Ciencias Agrarias y los laboratorios de Biotecnología y cultivo *in vitro* por el acceso a materiales y equipos.

Agradecemos al Herbario (CAUP) y a la Unidad de Microscopia Electrónica de la Universidad del Cauca por el apoyo en la descripción de los cultivares

Agradecemos al Proyecto “Desarrollo Tecnológico para la Obtención de Productos Orgánicos e Innovadores de Seda Natural” financiado por el Sistema General de Regalías.

Agradecemos al grupo de investigaciones en Sistemas Integrados de Producción Agropecuaria, Forestal y Acuícola (SISINPRO).

Agradecemos a los sericultores Luis Paz, Antonio Marín y José Cortez por el acceso a sus fincas y cultivos de morera.

Finalmente, agradecemos a amigos por el apoyo y los buenos momentos compartidos durante nuestra etapa universitaria.

## RESUMEN

La planta de morera (*Morus spp.*) es el alimento fundamental del gusano de seda (*Bombyx mori* L.) y por lo tanto constituye un factor determinante en la sericultura. La morera se propaga convencionalmente por estacas, acodos e injertos; métodos que suelen ser lentos con pobre desarrollo radicular y que exigen exceso de mano de obra, lo cual restringe el aprovechamiento y acceso a cultivares de morera. Esta investigación permitió adelantar estudios en el desarrollo de un protocolo para la desinfección y el establecimiento *in vitro* de los cultivares de *M. alba* cultivar Kanva 2 y *M. australis* cultivar Taig song a partir de segmentos nodales no lignificados. Inicialmente se evaluaron dos fuentes de segmentos nodales: plantas establecidas en campo (segmentos nodales lignificados) y brotes desarrollados a partir de yemas axilares de estacas colocadas en agua bajo condiciones ambientales controladas durante 3 semanas (segmentos nodales no lignificados), en el caso del cultivar Taig song no se logró la inducción de brotes de manera eficiente. Los explantes fueron sometidos a tratamientos de desinfección en cabina de flujo laminar y posteriormente fueron inoculados en medio de cultivo MS suplementado con 0,25 mg/L de BAP. La desinfección de los segmentos nodales no lignificados de *M. alba* cultivar Kanva 2 se logró empleando etanol (70%) por 1 min, peróxido de hidrógeno (2%) por 2 min e hipoclorito de sodio (2%) por 10 min; sin embargo ningún tratamiento logró la desinfección de los segmentos nodales lignificados sin oxidarlos en el proceso. La investigación espera contribuir a la promoción, extensión y aprovechamiento de la sericultura como una actividad económica alternativa que impulse el progreso de la comunidad caucana.

## INTRODUCCIÓN

La morera (*Morus spp.*) es un insumo indispensable para la sericultura por ser la única fuente de alimento del gusano de seda, siendo de gran importancia disponer de cultivares de buena calidad, puesto que la cría del gusano de seda y la producción de capullos dependen de esto (Cifuentes y Sohn, 1998); Kanva 2 y Taig song son cultivares agronómicamente importantes para la sericultura en del departamento del Cauca.

La morera tiene reproducción asexual, se propaga por estacas, injertos y acodos (Cifuentes y Sohn, 1998), siendo la reproducción por estacas el método más utilizado, aunque es lento e inviable económicamente por el exceso de mano de obra y el pobre desarrollo radicular (Bhau y Wakhlu, 2001); para aprovechar todo el potencial de estas especies se hace necesario aplicar técnicas biotecnológicas como el cultivo *In vitro*.

El cultivo *In vitro* tiene diversas aplicaciones, la más empleada es la propagación masiva de plantas, que tiene como ventajas: los altos índices de multiplicación, la introducción rápida de nuevos cultivares, el control de las condiciones ambientales y la sanidad (Murashige y Huang, 1985); además para algunos cultivares de morera que presentan respuesta mínima a la propagación en campo – como Taig song - el cultivo *In vitro* es la única opción viable de propagación.

A nivel mundial se han realizado trabajos en propagación *In vitro* de morera empleando explantes provenientes de yemas apicales, axilares y segmentos nodales (Vijayan *et al*, 2011); sin embargo en Colombia son escasos, siendo el más reciente el realizado por Cortes y Perea (2001), por lo tanto han sido pocos los progresos en cultivo *In vitro* de morera en el país.

Este estudio espera contribuir al fortalecimiento de la sericultura en el departamento del Cauca, a través de la investigación de métodos de propagación

*in vitro* en dos cultivares de morera agronómicamente importantes (Kanva 2 y Taig song), con el fin de encontrar el método más eficiente de propagación y aportar a la investigación para el aprovechamiento de cultivares de morera más productivos.

El estudio comprendió 3 fases: Selección de la fuente de material vegetal; desarrollo del protocolo en laboratorio que incluye la desinfección y el establecimiento del cultivo; y finalmente el análisis de los resultados obtenidos.

## 1. JUSTIFICACIÓN

Colombia cuenta con alrededor de 284 familias involucradas en la cadena productiva de la seda, siendo el departamento del Cauca el centro de producción y donde se concentran la mayor cantidad de familias y personas vinculadas en la cadena serícola en Colombia y Latinoamérica, con 130 familias sericultoras y 70 familias de artesanos que se encuentran en su mayoría agremiados en la Corporación para el Desarrollo de la Sericultura del Cauca CORSEDA (Corseda, 2007).

Lemos (2012) y Aznar y Salvador (2013) proyectaron un incremento de la demanda de seda debido a la tendencia mundial de volver a las fibras naturales y a la nueva gama de aplicaciones desarrolladas para los productos provenientes de la cadena serícola, incluyendo la morera, que según Salas *et al* (2006) se proyecta como arbusto forrajero que podría mejorar la sostenibilidad de la ganadería regional. El departamento del Cauca tiene una ventaja especial debido a que la sericultura está certificada como orgánica, característica que es muy apreciada por los principales países consumidores: Estados Unidos, Alemania, Japón, España, Italia y Francia (Corseda, 2007); por lo tanto es necesario dirigir esfuerzos para extender y aprovechar la creciente demanda de productos de la sericultura.

La morera (*Morus spp.*) constituye un eslabón importante en la sericultura por ser el alimento exclusivo del gusano de seda, Kanva 2 y Taig song son dos cultivares agrónomicamente importantes en el departamento del Cauca y es necesario aplicar las técnicas biotecnológicas para aprovechar todo su potencial agronómico (García *et al*, 2000).

La morera puede ser propagada por métodos sexuales y asexuales: los primeros no se recomiendan por falta de control sobre la calidad de los árboles producidos (debido a la heterocigocidad de las plantas madre) así como su poca viabilidad económica, los segundos -estacas, injertos y acodos- son los más empleados para

mantener las características de la planta madre pero son lentos e inviables para algunos cultivares con escasa respuesta a la propagación en campo, como Taig song (Bhau y Wakhlu, 2001; Cifuentes y Sohn, 1998); sin embargo las técnicas de cultivo *In vitro* permiten propagar estos cultivares y obtener plantas con sanidad controlada y en mayor número empleando un espacio relativamente pequeño (Levitus *et al*, 2004).

Se han adelantado pocos estudios en propagación *in vitro* de los cultivares de morera disponibles en Colombia y en particular en el departamento del Cauca, por lo tanto se evaluaron dos métodos de propagación *In vitro* de dos cultivares agronómicamente importantes: Kanva 2 y Taig song, en el marco del proyecto: Desarrollo Tecnológico para la Obtención de Productos orgánicos e Innovadores de Seda Natural, financiado por el Sistema General de Regalías y ejecutado por la Universidad del Cauca y la Gobernación, el cual tiene como propósito fortalecer el desarrollo de la cadena serícola en el Cauca.

## 2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

### 2.1. LA SERICULTURA

La sericultura es la actividad agroindustrial de producción comercial del hilo de seda, a partir de la cría del gusano de seda (*Bombyx mori* L.), el cual se alimenta exclusivamente de la hoja de la morera (*Morus spp.*), en esta actividad se combinan técnicas agrícolas, pecuarias y textiles, para la producción de capullos, obteniendo finalmente la fibra textil (Cifuentes y Sohn, 1998).

La historia de la sericultura en Colombia se remonta al año de 1868, cuando el doctor Manuel Vicente de la Roche introdujo y aclimató morera y gusanos de seda en el país, sin embargo la sericultura no prosperó hasta un siglo después, en 1968, cuando la Federación Nacional de Cafeteros reintrodujo la sericultura en un campo experimental de CENICAFÉ y posteriormente la difundió entre los agricultores de la zona cafetera, el Cauca y Valle del Cauca; regiones donde alcanzó su mayor auge a finales de los años 80, sin embargo la caída del precio internacional de la seda en los años 90 ocasionó la desaparición paulatina de la sericultura en diferentes zonas del país (Cifuentes y Sohn, 1998).

En la actualidad la sericultura en Colombia se desarrolla únicamente en el departamento del Cauca, donde la mayoría de familias sericultoras están asociadas a CORSEDA, una empresa conformada por diez asociaciones locales de productores y artesanos de seda en los municipios de Timbío, El Tambo, Piendamó, Morales y Santander de Quilichao. CORSEDA busca mejorar la capacidad de negociación, unificar parámetros de producción y brindar a las familias serícolas cobertura en temas de seguridad social (Corseda, 2014).

## **2.2. LA MORERA**

### **2.2.1. Origen y distribución**

La morera (*Morus* spp.) es originaria de China, fue domesticada hace aproximadamente 5000 años en los países asiáticos para la alimentación del gusano de seda (Kitahara *et al*, 2001) y en la actualidad se conocen diversos cultivares distribuidos en todo el mundo, tanto en zonas templadas como en zonas subtropicales y tropicales (Mendonça *et al*, 2010); esta amplia distribución refleja la adaptabilidad de la morera a diversas condiciones ambientales (Cifuentes y Sohn, 1998).

### **2.2.2. Biología**

La morera es una planta dicotiledónea de la familia Moraceae y del género *Morus*, las características botánicas principales del género *Morus* son: árboles o arbustos perennes deciduos, con látex, hojas alternas simples o lobuladas, márgenes dentados, inflorescencia en amento, dioicos o monoicos, flores femeninas con o sin estilo y con estigma bicarpelar, frutos carnosos múltiples en forma de mora (Li, 2007; Tingzing *et al*, 1988), las yemas se dividen en terminales y laterales o axilares de acuerdo con el punto de crecimiento de las ramas, éstas se pueden clasificar en yemas de hojas, de flores o mixtas, las cuales se pueden encontrar activas o en estado de dormancia (Cifuentes y Sohn, 1998).

### **2.2.3. Agronomía**

En este estudio se emplea la palabra cultivar para referirnos a Kanva 2 y Taig song con base en la Resolución 970 de 2010 del ICA que define cultivar como: “nombre genérico que se utiliza para referirse indistintamente a variedades, líneas, híbridos y clones que se estén utilizando como materiales comerciales para siembra”; la palabra variedad fue descartada en este estudio ya que presenta diferente significado en las ciencias biológicas puesto que se define como un



rango taxonómico, en contraste la palabra cultivar se utiliza para referirse a un individuo que se obtiene por selección artificial como lo son Kanva 2 y Taig song.

La morera es un árbol de uso agroforestal que ha sido explotado comercialmente en la industria de la sericultura, dado que el follaje constituye la única fuente de alimento del gusano de seda o *Bombyx mori* L. (Li, 2007).

La morera es una planta perenne que puede vivir incluso por más de mil años, por lo tanto un cultivo de morera puede proporcionar follaje para la cría del gusano por largo tiempo, siempre y cuando se realicen podas de rejuvenecimiento a partir del tercer año de edad, ya que después de esta edad se forma un callo de producción (cacho de venado) que dificulta el manejo y las labores del cultivo (Cifuentes y Sohn, 1998).

Según Cifuentes y Sohn (1998) el desarrollo natural de la morera presenta una estrecha relación con las condiciones ambientales como luz, temperatura, aire, agua, sales minerales y el suelo. La morera se propaga de manera convencional por estacas puesto que la formación de raíces, ramas y hojas, es más rápida que con la propagación por acodo e injertos, se recomienda usar estacas de 15 a 20 cm de longitud, con tres yemas en buen estado, utilizando la parte media de las ramas dado que esto garantiza tanto el enraizamiento como la brotación de las yemas.

Las hojas de la morera se cosechan cada tres meses para la alimentación del gusano de seda, después de lo cual se realiza la poda de cosecha que consiste en cortar las ramas a un centímetro por encima de la poda anterior (Cifuentes y Sohn, 1998).

## **2.3. ASPECTOS GENERALES PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *in vitro* DE MORERA**

### **2.3.1. El explante**

Los explantes son piezas aisladas de la planta que pueden ser protoplastos, células individuales, tejidos u órganos, mediante los cuales se puede conseguir la regeneración de plantas completas (Levitus *et al*, 2004). La propagación de plantas de morera a partir de yemas apicales y segmentos nodales ha sido el método más usado (Vijayan *et al*, 2011), esto probablemente se debe a que el método permite obtener un gran número de plántulas en tiempo corto y espacio reducido, y sin variación somaclonal o variación genética debida al cultivo *In vitro* (George *et al*, 2008a).

Las características que debe tener un explante de morera para maximizar su repuesta a la propagación por cultivo *In vitro* son: un tamaño aproximado de 2 cm, el cual le permite al explante sobrevivir a la transferencia a las condiciones *In vitro* e iniciar el desarrollo rápidamente, sin embargo en la práctica el tamaño del explante será el mayor que se pueda obtener en condiciones asépticas (George *et al*, 2008a); los explantes deben provenir de tallos juveniles o adultos de máximo 1 año de crecimiento (Vijayan *et al*, 2011); y los tallos deben ser colectados en verano debido a que esto disminuye los porcentajes de contaminación y aumenta los porcentajes de brotación (Chitra y Padmaja, 2002; George *et al*, 2008d); además se recomienda el uso de plantas cultivadas en invernadero como fuente de material vegetal para reducir la cantidad de microorganismos asociados al explante y facilitar su desinfección (Levitus *et al*, 2004).

### **2.3.2. Asepsia**

Los explantes deben someterse a un proceso de desinfección que garantice la eliminación total de microorganismos con el menor daño posible para el explante. Los compuestos químicos comúnmente empleados son etanol (70%v/v),

hipoclorito de sodio (1–3%), peróxido de hidrógeno (2–3%), detergente tween 20 (0.2%), además del agua destilada estéril y otros compuestos desinfectantes, para tratar explantes de morera provenientes de campo es común el uso de cloruro de mercurio (0,1-1,5 %) (Chitra y Padmaja, 1999; Tewari *et al*, 1999; Balakrishnan *et al*, 2009), se recomienda precaución al emplear el cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>), dado que es altamente tóxico y no es removido con facilidad del explante (Levitus *et al*, 2004). Tratamientos físicos como la inmersión en agua entre 40 – 60°C (Termoterapia) son alternativas al uso de sustancias químicas (Martínez, 1987; Salazar y Surga, 1998).

Los medios e instrumentos de cultivo también deben pasar por un proceso de esterilización, el cual se puede realizar mediante llama directa, calor húmedo o seco, agua caliente, hornos y/o microondas. Es recomendable realizar el cultivo de los explantes en una cámara de transferencia con aire estéril e incubarlos en cámaras o cuartos de cultivo cerrados, libres de corrientes de aire y bien higienizados. También los operarios deben minimizar las fuentes de contaminación externa haciendo uso de indumentaria y prácticas adecuadas (Sajeevan *et al*, 2011).

### **2.3.3. Medios de cultivo**

El medio base más utilizado para propósitos de propagación *In vitro* de morera es el medio MS junto con otros componentes tales como: fuente de carbono, fitorreguladores, agente gelificante entre otros (Levitus *et al*, 2004).

El medio de cultivo MS es la formulación desarrollada por Murashige y Skoog (1962) que proporciona los macro y micronutrientes esenciales para el desarrollo de la planta. Actualmente algunas formulaciones comerciales suelen añadir otros compuestos orgánicos que se consideran necesarios para el desarrollo de la planta como: tiamina, ácido nicotínico, piridoxina y mio-inositol (George *et al*, 2008d; George *et al*, 2008e)

Los carbohidratos son agentes osmóticos y la principal fuente de carbono que contribuye al rápido crecimiento de las plantas en un cultivo *In vitro*, siendo la sacarosa la más empleada (George *et al*, 2008e). Según Oka y Ohyama (1982) la glucosa, y aún más la fructosa (3%) son mejores fuentes de carbono que la sacarosa para la propagación de brotes de morera, observaciones que fueron corroboradas por Chitra y Padmaja (2002), quienes obtuvieron 6,5 veces más brotes al emplear fructosa en lugar de sacarosa en cultivares de *Morus indica*, además Lu (2002) obtuvo un número de brotes ligeramente mayor al emplear fructosa en lugar de sacarosa en un cultivar de *Morus latifolia*; sin embargo Enmoto (1987) encontró que la sacarosa proporciona mejores resultados para la micropropagación de brotes en *Morus alba*, por lo tanto la fuente de carbono adecuada para la propagación de morera depende de la especie que se quiera trabajar.

Los fitorreguladores son fundamentales en el proceso del desarrollo de las plantas, las auxinas y las citoquininas son los más empleados en el cultivo *In vitro* porque promueven el crecimiento de yemas durmientes debido a su capacidad de estimular el progreso de las células en las etapas del ciclo celular (George *et al*, 2008b, 2008c) además las auxinas promueven la activación de ciertos genes en regiones ectópicas (regiones donde normalmente no se expresan), evento que desencadena la formación de nuevas raíces a partir de otros tejidos (Gutiérrez, 2012). Los fitorreguladores más empleados para promover la multiplicación, elongación y enraizamiento de los brotes en cultivo *In vitro* de morera son: la bencil amino purina (BAP) y el ácido naftalenacético (NAA) (Vijayan *et al*, 2011).

El agar es el agente gelificante más empleado en cultivo *In vitro*, para micropropagar morera se ha empleado en concentraciones de 0.6% a 1%, aunque ésta última tiene efecto inhibitorio (Oka y Ohyama, 1978; Zaman *et al*, 1992). Lo habitual es usar una concentración de 0.8% (Patel *et al*, 1983; Mhatre *et al*, 1985; Enmoto, 1987; Pattnaik y Chand, 1997; Iwai *et al*, 2002; Thomas, 2003), también

puede emplearse agarosa (0,8 - 0,9%) o phytigel (0,25 - 0.40%) (Levitus *et al*, 2004), éste último tiene la ventaja de producir geles rígidos a menor concentración que otros agentes gelificantes lo cual permite una mejor absorción de los nutrientes, además de ser más transparente lo cual permite visualizar rápidamente la contaminación (Hall, 1999).

#### **2.3.4. Condiciones ambientales del cultivo *in vitro***

El ambiente físico en el cual se incuban los cultivos puede afectar su crecimiento, diferenciación, captación de nutrientes entre otros, por lo tanto es necesario establecer los cultivos bajo condiciones ambientales controladas, verificando aspectos como la temperatura, calidad e intensidad de luz, fotoperiodo, humedad atmosférica, pH e higiene (Levitus *et al*, 2004). En morera los explantes son incubados bajo temperaturas de  $25\pm 2$  °C y fotoperiodo de 16/8 horas de Luz/oscuridad (Tewari *et al*, 1999; Kavyashree, 2007; Chattopadhyay *et al*, 2011; Lalitha *et al*, 2013).

#### **2.4. PROPAGACIÓN POR CULTIVO *in vitro* DE TEJIDOS VEGETALES**

La propagación por cultivo de tejidos emplea un conjunto de técnicas destinadas a la multiplicación de plantas, bajo condiciones artificiales adecuadas y controladas, que se emplea como una herramienta útil para producir plantas con sanidad controlada o de difícil propagación (Levitus *et al*, 2004).

Una planta adulta cuenta con tejidos que presentan células totipotentes capaces de desarrollar una planta completa, es por eso que la morera puede producir una nueva planta a partir de una estaca; en laboratorio se ha logrado reproducir este proceso cultivando explantes de forma aséptica y estimulando el desarrollo de hojas, tallos y frutos mediante fitorreguladores, sin embargo los mecanismos moleculares que controlan estos procesos no están del todo claros (Gutiérrez, 2012).

La propagación por cultivo *In vitro* consta de 5 etapas: primera selección y preparación del material vegetal, teniendo en cuenta el aspecto sanitario de la planta donante, el tipo de órgano que servirá como explante, la edad ontogénica y fisiológica del mismo, la estación de colecta y tamaño entre otros aspectos; segunda el establecimiento de un cultivo aséptico y viable; tercera la producción de brotes que en morera consiste de 2 sub-etapas, la primera consiste en la multiplicación de brotes y la segunda en su elongación hasta obtener una tamaño adecuado; cuarto el enraizamiento *In vitro*, que en ocasiones se realiza *ex vitro* junto a la siguiente etapa para disminuir costos y quinto la adaptación de las plántulas al medio ambiente externo (Murashige, 1974; Debergh y Maene, 1981; Levitus *et al*, 2004; George *et al*, 2008a).

#### **2.4.1. Propagación en *Morus indica* L.**

*Morus indica* es un nombre taxonómicamente no aceptado pero se sigue utilizando para referirse a la especie a la que pertenecen los cultivares sobre los cuales se han adelantado estudios, incluyendo Kanva 2 (K2) y otros cultivares que bajo la taxonomía actual pertenecen a *Morus alba* (Tewari *et al*, 1999; Kavyashree, 2007; Chitra *et al*, 2014).

Oka y Ohyama (1974; 1975; 1978; 1982) fueron los primeros en emplear el cultivo *In vitro* para propagar *Morus spp.* Mhatre *et al* (1985) trabajaron en *Morus indica* logrando inducir brotes múltiples sumergiendo yemas axilares en una solución con 0,25 mg/l de BAP (6-Bencilaminopruina) durante 48 h y luego sembrándolas en un medio de cultivo con la misma concentración de BAP, adicionalmente lograron enraizar los brotes en un medio de cultivo libre de fitorreguladores; sin embargo la aplicación de este trabajo es limitada porque se desconoce el cultivar o cultivares que fueron empleados en el estudio.

Tabla 1. Medios de cultivo y fitorreguladores empleados para la propagación *in vitro* de cultivares de *Morus indica* L.

Cultivar	Explante	Medio de cultivo y Fitorreguladores (mgL <sup>-1</sup> )			Referencia
		Multiplicación	Elongación	Enraizamiento	
—	Yema axilar	MS + IBA (0.5) +2,4D (1) + NAA (0.5)	MS + IBA (0.5) + 2,4D (0.5) + NAA (0.5)	MS + Kn (1) +NAA (0.5)	Patel <i>et al</i> (1983)
—	Yema axilar	MS + BAP (2)	MS + BAP (2)	MS	Mhatre <i>et al</i> (1985)
—	Yema axilar	MS	MS	MS	Bapat <i>et al</i> (1987)
S1	Yema apical	MS + BAP (0,75) + NAA (0.2)	MS + BAP (3) + NAA (0,2)	½ MS + NAA (0,2)	Chattopadhyay <i>et al</i> (1990)
S1	Segmento nodal	MS + BAP (2) + Tyr (50)	MS + BAP (2) + Tyr (50)	MS + IBA (0,1)	Islam <i>et al</i> (1994)
V1	Yema apical	MS + BAP (2) + NAA (0,1)	MS + BAP (2) + NAA (0,1)	MS + NAA (0.1) + IBA (1)	Tewary <i>et al</i> (1995)
S34		MS + BAP (2)	MS + BAP (2)	MS + NAA (0.1) + IBA (1)	
S1	Yema apical	MS + BAP (2)	MS + BAP (2)	MS + NAA (0.5)	Chakraborti <i>et al</i> (1998)
-----	Yema apical	MS + CPPU (0,5)	MS+ CPPU (0,5)	MS + CPPU (0,5)	Tewary y Oka (1999)
	Yema axilar	MS + CPPU (0,5)	MS + CPPU (0,5)		
M5	Segmento Nodal	MS + BAP (0,5)	MS + BAP (0,5)	MS + 2,4-D (1)	Chitra y Padmaja (1999)
K2, RFS175	Segmento nodal	MS + TDZ (0,1)	MS + TDZ (0,1)	MS + NAA (1) + CA (0.1%)	Tewari <i>et al</i> (1999)
S1		MS + TDZ (0,5)	MS + TDZ (0,5)	MS + NAA (0,1) + CA (0.05%)	
K2	Segmento nodal	MS + BAP (0,25)	MS	MS + IBA (0,5)	Cortes y Perea (2001)

Cultivar	Explante	Medio de cultivo y Fitorreguladores (mgL <sup>-1</sup> )			Referencia
		Multiplicación	Elongación	Enraizamiento	
M5	Segmento nodal	MS + BAP (0,5)	MS + BAP (0,5)	MS + 2,4-D (1)	Chitra y Padmaja (2002)
S13 S36		MS + BAP (0,5)	MS + BAP (0,5)	MS + 2,4-D (1)	
S54	Yema apical	LSBM + BAP (2) + TIBA (0,5)	LSBM + BAP (2) + TIBA (0,5)	Ex vitro MS + NAA (1)	Kavyashree (2007)
M5	Segmento nodal	MS + BAP (2)+ Kn (0,5)	MS + BAP (2)	MS + IBA (0,5)	Balakrishnan <i>et al</i> (2009)
	Yema apical	MS + BAP (5)+ Kn (1,1)	MS + BAP (2)		
S1	Yema axilar	MS + BAP (2)	MS + BAP (2)	MS + NAA (1)	Chattopadhyay <i>et al</i> (2011)
V1	Segmento nodal	MS + BAP (1)+ TDZ (0.1) + NAA (0.25)	MS + BAP (1) + NAA (0.25) + GA <sub>3</sub> (0.5)	MS + IBA (0.5)	Sajeevan <i>et al</i> (2011)
S1635	Segmento nodal	MS + TDZ (2)	MS + BAP (2) + GA <sub>3</sub> (0.5)	½ MS + IBA (2)	Lalitha <i>et al</i> (2013)
S36	Brotos	MS + BAP (0,5)	MS + BAP (0,5)	MS+ IBA (0,1)	Chitra <i>et al</i> (2014)

S: Sunjampur, V: Victoria, K: Kanva, M: Mysore; MS: Medio Murashige y Skoog (1962); LSBM: Medio Linsmaier y Skoog (1965); 2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; BAP: 6-Bencilaminopurina; IBA: ácido indol-3-butírico; GA<sub>3</sub>: ácido giberelico; TDZ: Thidiazurón; NAA: ácido 1-naftalenacético; CPPU: forclorfenuron; Kn: kinetina; CA: carbón activado; TIBA: ácido 2,3,5-triyodobenzoico; Tyr: tirosina.



En estudios posteriores se desarrollaron protocolos para propagar cultivares de *Morus indica* (Tabla 1) empleando yemas apicales, axilares o segmentos nodales e implementando el uso de fitorreguladores adicionales (TIBA o ácido 2,3,5-triyodobenzoico, TDZ o thidiazurón, CPPU o forclorfenuron y GA<sub>3</sub> o ácido giberélico). Kanva 2 también es conocida como Mysore 5, sin embargo ambos nombres parecen referirse a la misma variedad (Acharya, 1994; Central Silk Board, 1997, 1999; RAPA y FAO, 1989).

El BAP ha sido el fitorregulador más empleado en la etapa de multiplicación, probablemente debido a su disponibilidad, investigadores como Cortes y Perea (2001), Lalitha *et al* (2013) y Tewari *et al* (1999) reportan la formación de 2 a 4 brotes por explante, sin embargo Lalitha *et al* (2013), Sajeevan *et al* (2011) y Tewari *et al* (1999) han reportado mejores resultados al emplear únicamente TDZ o en combinación con BAP, logrando inducir entre 5 a 8 brotes por explante. El TDZ es una citoquinina derivada de la fenilurea que ha sido usada para la propagación de especies leñosas porque induce la formación de un mayor número de brotes que BAP (Elobeidy y Korban, 1988; Huetteman y Preece, 1993), efecto que también se ha podido observar en algunos cultivares de *Morus spp.* Adicionalmente Chitra y Padmaja (2002) reportan la formación de 6 a 8 brotes por explante empleando medio de cultivo suplementado con BAP, sin embargo estos resultados fueron observados al sustituir la sacarosa por la fructosa.

En los trabajos de propagación *In vitro* es común usar medio de cultivo con la misma composición para las etapas de multiplicación y elongación de los brotes (Tabla 1), sin embargo no es recomendable usar TDZ en ambas etapas ya que con el tiempo promueve la formación de callo en la base del explante e inhibe la elongación de los brotes, por lo cual autores como Lalitha *et al* (2013) y Sajeevan *et al* (2011) remplazaron el TDZ empleado en la multiplicación, por BAP combinado con GA<sub>3</sub> para promover la elongación de los brotes.

IBA y NAA son los fitoreguladores más empleados en el enraizamiento en morera (*Tabla 1*), Lalitha *et al* (2013) reportaron que IBA dió los mejores resultados, seguido de NAA e IAA, en cuanto a porcentaje de enraizamiento, velocidad de inducción de raíces, número de raíces por explante, longitud y grosor de las raíces en la variedad S1635; sin embargo Chitra y Padmaja (2002) reportan que la efectividad de IBA, NAA e IAA, depende del cultivar en el cual se trabaje.

Chitra y Padmaja (1999, 2002) reportan mejores resultados en Kanva 2 al emplear 2,4-D en lugar de IBA o IAA, incluso no lograron inducir raíces empleando NAA (1 mg/L); sin embargo Tewari *et al* (1999) lograron inducir raíces empleando NAA (1 mg/L) y carbón activado (0.1%), pero se encontró que concentraciones por encima del 0.2% inhiben el desarrollo de las raíces en Kanva 2 (Chitra y Padmaja, 1999).

#### **2.4.2. Propagación en *Morus australis* Poir.**

Taig song (morera de Taiwan en el lenguaje original) es un cultivar que debe su nombre a la isla de Taiwán, que era conocida como isla Formosa del portugués que significa hermosa (Garcia *et al*, 2000; Gonzáles y Gómez, 1997), este cultivar se relaciona con *Morus formosensis* Hotta sinonimia de *Morus australis* Poir (Li, 2007).

En cultivares relacionados con *Morus formosensis* no hay trabajos realizados en cuanto a propagación *In vitro* y en *M. australis* se han reportado pocos trabajos de los cuales no se conocen los cultivares empleados. Pattnaik *et al* (1996) utilizaron segmentos nodales de *M. australis* y medio MS suplementado con BAP (1 mg/L) y GA<sub>3</sub> (0,3 mg/L) para lograr la multiplicación y la elongación de los brotes; el enraizamiento se logró en medio MS a la mitad de la concentración sugerida en la etiqueta suplementado con una combinación de 1 mg/L con cada uno de los fitoreguladores IAA, IBA y IPA. Pattnaik *et al* (2000) también encapsularon yemas axilares obtenidas de segmentos nodales cultivados *In vitro* en medio MS, suplementado con BAP (1 mg/L) durante la multiplicación y la elongación.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. GENERAL**

Determinar un método alternativo de propagación de dos variedades de Morera: Taig song y Kanva 2 (*Morus alba* L.), mediante el desarrollo de un protocolo adecuado de cultivo *In vitro* para el beneficio de la sericultura, principalmente en el departamento del Cauca.

#### **3.2. ESPECÍFICOS**

- Seleccionar y preparar las plantas donadoras del material vegetal para el establecimiento del cultivo *In vitro*.
- Estandarizar un protocolo de desinfección del material vegetal.
- Determinar la composición química más adecuada para los medios de cultivo destinados a la multiplicación, elongación y enraizamiento.

## 4. METODOLOGÍA

El estudio comprendió 3 fases: Selección de la fuente de material vegetal en campo y en condiciones ambientales controladas de *M. aba* cultivar Kanva 2 y *M. australis* cultivar Taig song; trabajo en laboratorio que incluye la desinfección de los explantes y el establecimiento del cultivo *in vitro* con material vegetal proveniente de ambas fuentes; y finalmente el análisis de los resultados obtenidos.

### 4.1. SELECCIÓN DE LA FUENTE DE MATERIAL VEGETAL

#### 4.1.1. Selección de los cultivos de morera

Inicialmente fue realizada una revisión bibliográfica y entrevistas informales a sericultores reconocidos por su trayectoria, para ubicar los sitios representativos de la sericultura en el Cauca, una vez identificados se realizaron visitas (*Figura 1*). Finalmente se pre-seleccionaron los cultivos de morera presentes en 3 fincas como fuente del material vegetal para el cultivo *In vitro* (*Tabla 2*).



Figura 1. Cultivo de *M. alba* cultivar Kanva 2 ubicado en la finca sericultora La Aurora.

Los cultivos de morera empleados como fuente de explantes, fueron seleccionados con base en criterios agronómicos (prácticas de manejo y mantenimiento que los sericultores realizan a los cultivos de morera) para

garantizar el buen estado y edad fisiológica de las plantas, fueron tenidos en cuenta los siguientes criterios: aspecto y altura de las plantas en la poda de cosecha, cuidados del material vegetal y producción de hoja, criterios directos que influyen en el éxito de la propagación *in vitro* (Levitus *et al*, 2004); además se tuvo en cuenta criterios indirectos tales como: producción y calidad del capullo y número de crías por año que influyen en el mantenimiento y rotación del cultivo de morera.

Tabla 2. Ubicación de los cultivos de *M. alba* cultivar Kanva 2 y *M. australis* cultivar Taig song, pre-seleccionadas como fuente del material vegetal.

Cultivar	Finca	Ubicación	Municipio	Propietario
Kanva 2	El Madroño	Vereda Santa Bárbara, corregimiento de Piagua	El Tambo	Antonio Marín
Taig song Kanva 2	La Isabela	Barrio la floresta Cabecera municipal	Piendamó	Luis Paz
Kanva 2	La Aurora	Vereda Alto Piendamó	Piendamó	José Cortez

#### 4.1.2. Descripción botánica de los cultivares

Fue realizada una descripción botánica con el propósito de verificar que las plantas de morera establecidas en las fincas pertenecían a los cultivares, que los sericultores habían reportado en las entrevistas con los nombres de Kanva 2 y Taig song.

Una parte del material vegetal de morera colectado fue empleado para introducir muestras en la colección del herbario de la Universidad del Cauca (CAUP). Las muestras fueron colectadas y procesadas siguiendo la metodología estándar de herborización y conservación para angiospermas (Sánchez y González, 2007).

La descripción botánica fue realizada empleando el libro de Morfología y Anatomía Vegetal (Becerra y Chaparro, 1999) y el manual técnico de sericultura (Cifuentes y Sohn, 1998), con apoyo de los equipos de la Unidad de Microscopía de la Universidad del Cauca. Las estructuras vegetales (inflorescencia, infrutescencia, flores, frutos, yemas y hojas) fueron identificadas mediante un estereoscopio (Nikon C-DSS115), el cual proporcionó soporte fotográfico (Nikon DS-2Mv), datos métricos y morfológicos.

Las imágenes fueron procesadas mediante el Software NIS-Elements F 2.30. SP2 (Build 332) e ImageJ (1.48v). Los datos se analizaron y compararon con claves taxonómicas y se esquematizaron en cuadros descriptivos y comparativos.

#### **4.1.3. Selección de las plantas donadoras**

Las plantas donadoras de explantes fueron seleccionadas teniendo en cuenta los siguientes criterios: ausencia de patógenos, edad, altura y grosor de las ramas y coloración de las hojas.

Las ramas de los cultivares de morera Kanva 2 y Taig song (*Figura 2*) fueron colectadas y transportadas enteras para evitar pérdidas por deshidratación. Las ramas fueron divididas en dos grupos: un grupo fue empleado para obtener brotes bajo condiciones de ambientales controladas y luego estos brotes fueron sometidos a pruebas de desinfección, el otro grupo fue utilizado para obtener segmentos nodales lignificados que se sometieron directamente a pruebas de desinfección.



Figura 2. Plantas de morera en campo: a) *M. alba* Cultivar Kanva 2, finca La Aurora. b) *M. australis* Cultivar Taig song, finca La Isabela.

#### 4.1.4. Evaluación de la brotación de yemas en condiciones de ambientales controladas

Las ramas del cultivar Kanva 2 y Taig song destinadas para la obtención de brotes en condiciones de ambientales controladas fueron tratadas siguiendo el método propuesto por Cholo y Delgado (2011), éstas fueron cepilladas y lavadas con detergente e hipoclorito de sodio (0,5%) por 20 min, luego fueron cortadas en estacas de 15 cm de long. con 3 yemas axilares, obteniéndose 6 estacas por rama, que fueron colocadas en recipientes con agua bajo condiciones ambientales controladas, durante 3 semanas con una reposición de agua cada semana (*Figura 3*). Las estacas fueron clasificadas según su posición en la rama (basal, central y apical) y se registró el tiempo transcurrido para la brotación de las yemas, la longitud y diámetro del tallo en los brotes y el número de brotes por estaca, con el fin de seleccionar el tipo de estaca adecuado como fuente de brotes para las etapas de desinfección y establecimiento.





Figura 3. Estacas de *M. alba* cultivar Kanva 2 en proceso de brotación en condiciones ambientales controladas.

La inducción para la brotación de yemas fue realizada en un cuarto con condiciones ambientales controladas: 25 °C y 45% de temperatura y humedad relativa durante el día, respectivamente; 18 °C y 80% de temperatura y humedad relativa durante la noche, respectivamente; libre de corrientes de aire y cubierto con tejas translúcidas para proporcionar luz natural al espacio.



## 4.2. DESINFECCIÓN

Los segmentos nodales provenientes de las dos fuentes: plantas establecidas en campo y brotes desarrollados en condiciones ambientales controladas, fueron evaluados en la etapa de desinfección y fue seleccionada la mejor fuente.

### 4.2.1. Desinfección de segmentos nodales provenientes de campo

Las ramas provenientes de campo, fueron cepilladas y lavadas con jabón antibacterial, estas se cortaron a 1,5 cm de long. para obtener los segmentos nodales lignificados (*Figura 4*), los cuales fueron lavados tres veces en agitación con agua corriente y una mezcla de tween 20 (4 gotas/100 ml) y triclosán (0,2 g/100 ml) durante 30 min. Los segmentos nodales fueron trasladados a cámara de flujo laminar donde fueron aplicados tratamientos con desinfectantes como: etanol, hipoclorito de sodio y sales de amonio cuaternario, los dos últimos fueron aplicados en combinación con tween 20 (4 gotas/100 mL) y triclosán (0,5 g/100 ml), adicionalmente fueron probados tratamientos con termoterapia (*Tabla 3*).

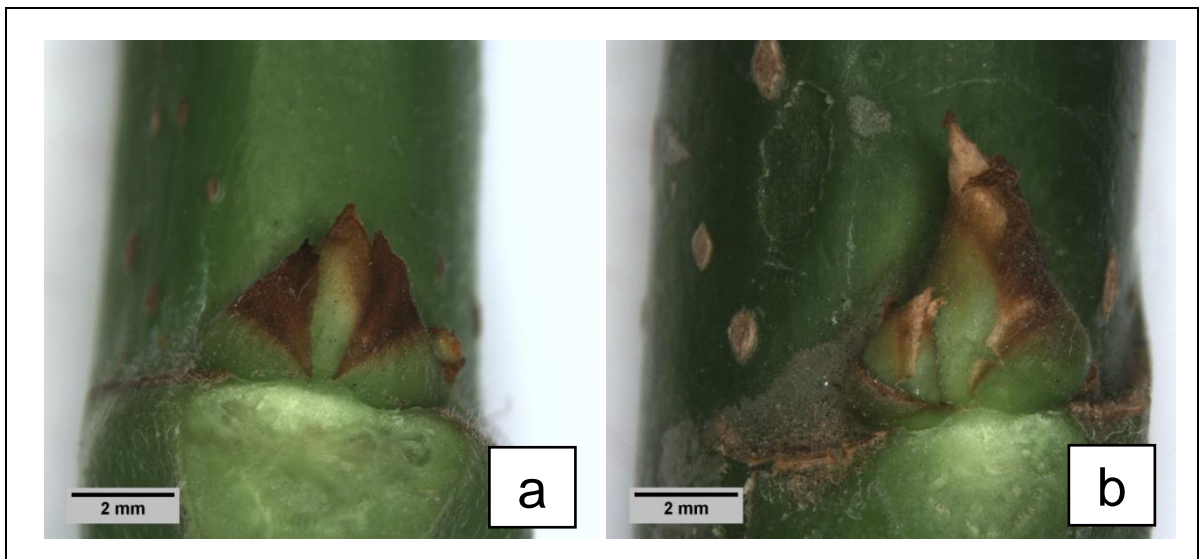


Figura 4. Explantes de morera provenientes de campo: a) Segmento nodal de *M. alba* cultivar Kanva 2. b) Segmento nodal de *M. australis* cultivar Taig song.

Tabla 3. Tratamientos aplicados para la desinfección de segmentos nodales de *M. alba* cultivar Kanva 2 provenientes de campo.

Ensayo	Etanol	NaClO	NR <sup>4+</sup>	T°
1	70% x 20 min	0,5% x 20 min	-----	-----
		1% x 20 min	-----	-----
		1,5% x 20 min	-----	-----
2	70% x 20 min	-----	0,25% x 20 min	-----
		-----	0,5% x 20 min	-----
		-----	1% x 20 min	-----
3	70% x 10 min	-----	1% x 10 min	40°C x 15 min
		-----		40°C x 30 min
		-----		40°C x 60 min
		-----		50°C x 15 min
		-----		50°C x 30 min
		-----		50°C x 60 min
4	70% x 5 min	-----	1% x 20 min	45°C x 45 min
	70% x 10 min	-----		
	70% x 15 min	-----		
	70% x 5 min	-----		50°C x 15 min
	70% x 10 min	-----		
	70% x 15 min	-----		

NaClO: hipoclorito de sodio, NR<sup>4+</sup>: amonio cuaternario, T°: Termoterapia, líneas punteadas (-----): no se aplicó en ese tratamiento

#### 4.2.2. Desinfección de segmentos nodales provenientes de brotes desarrollados en condiciones ambientales controladas.

Brotes de aproximadamente 3 cm de long. (*Figura 5*) fueron separados de la estaca y lavados tres veces en agitación con agua corriente y una mezcla de tween 20 (4 gotas/100 ml) y triclosán (0,2 g/100 ml) durante treinta min. Los brotes fueron trasladados a cámara de flujo laminar y se cortaron las yemas apicales y las hojas para obtener segmentos nodales no lignificados que fueron lavados mediante agitación con etanol al 70% por 1 min, posteriormente fueron aplicados tratamientos con peróxido de hidrógeno e hipoclorito de sodio, los cuales fueron empleados en combinación con tween 20 (4 gotas/100 mL) y triclosán (0,5g/100 ml) (.).

Tabla 4), los segmentos nodales no lignificados de Taig song fueron evaluados empleando el tratamiento que presentó los mejores resultados para Kanva 2.

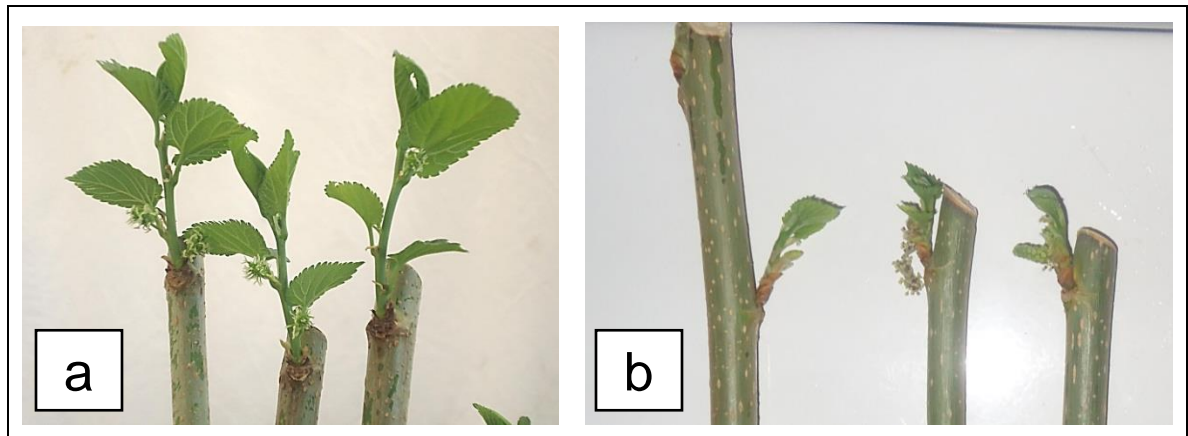


Figura 5. Brotes de morera con tres (3) semanas de desarrollo en condiciones ambientales controladas: a) Brotes de *M. alba* cultivar Kanva 2. b) Brotes de *M. australis* cultivar Taig song.

Tabla 4. Tratamientos aplicados para la desinfección de segmentos nodales no lignificados de *M. alba* cultivar Kanva 2.

Ensayo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NaClO
5	1% x 2 min	-----
	2% x 2 min	-----
6	2% x 2 min	0,5% x 10 min
		1% x 10 min
		2% x 10 min
		5% x 10 min
7	2% x 2 min	2% x 10 min
		2% x 15 min
		3% x 10 min
		3% x 15 min

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno, NaClO: Hipoclorito de sodio, líneas punteadas (-----): no se aplicó el reactivo en ese tratamiento.

### 4.3. ESTABLECIMIENTO

El medio de cultivo empleado fue MS basal (Murashige y Skoog, 1962) con sacarosa (3%), Phytigel (0.3% p/v) y suplementado con 0,25 mg/L de BAP. El pH

del medio de cultivo se ajustó a 5,8. Fueron vertidos 20 ml del medio de cultivo en cada recipiente y fueron esterilizados en autoclave a 121 °C por 20 min a 105 kPa.

Los segmentos nodales de ambas fuentes (campo y condiciones ambientales controladas) fueron inoculados en el medio de cultivo y mantenidos bajo condiciones de oscuridad durante una semana para evitar la oxidación; luego fueron incubados durante cuatro semanas a 25±2 °C y 70-80% de humedad relativa con un fotoperiodo de 16 horas, según condiciones reportadas en trabajos previos (Chitra y Padmaja, 2002; Kavyashree, 2007; Benedetta *et al*, 2007; Balakrishnan *et al*, 2009).

#### **4.4. ANALISIS ESTADÍSTICO Y DISEÑO EXPERIMENTAL**

La evaluación de la brotación de yemas en condiciones de ambientales controladas se realizó utilizando un diseño completamente al azar. Fueron aplicadas la prueba de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965) y la prueba de Levene (Levene, 1960), para determinar si las muestras cumplen simultáneamente con los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas. Fue empleada la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Kruskal y Wallis, 1952) para examinar la influencia de la posición de la estaca (basal, central o apical) en la rama sobre el número de los brotes de Kanva 2 desarrollados bajo condiciones ambientales controladas, longitud de los brotes, diámetro del tallo en el brote y tiempo transcurrido para la brotación. Las diferencias significativas fueron analizadas con el test post hoc automático, que se realiza junto con la prueba de Kruskal-Wallis en el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 19.0.

La influencia de los tratamientos de desinfección en los porcentajes de contaminación en segmentos nodales lignificados y no lignificados, fue analizada empleando tablas de contingencia y la prueba de  $X^2$  de Pearson, por tratarse de variables categóricas.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. SELECCIÓN DE LA FUENTE DE MATERIAL VEGETAL

#### 5.1.1. Selección de los cultivos de morera.

La finca La Aurora se distinguió porque presenta los cultivos de morera (*M. alba*) cultivar Kanva 2 más vigorosos y sanos así como las mejores prácticas de manejo agronómico, alta producción de follaje y buena calidad de capullo (*Tabla 5*), por lo tanto fueron seleccionados como fuente para la obtención del material vegetal de este cultivar; en contraste la finca El Madroño presentaba cultivos de Kanva 2 menos vigorosos posiblemente debido a manejos agronómicos inadecuados. Además los cultivos de morera de la finca La Isabela fueron seleccionados como fuente de material vegetal de morera (*M. australis*) cultivar Taig song por ser la única fuente identificada que presenta este cultivar.

#### 5.1.2. Descripción botánica de los cultivares

Los dos cultivares se diferencian principalmente por la expresión sexual: Kanva 2 presenta flores femeninas y flores perfectas mientras que Taig song solo presenta flores masculinas, Kanva 2 y Taig song también se diferencian por la forma de la hoja (entera y ocasionalmente lobulada, respectivamente) y el tamaño de las yemas (3,5 y 5 mm respectivamente). La estructura de la hoja entera es similar en ambos cultivares pero algunas características son más pronunciadas en Taig song (*Tabla 6*), además solamente Kanva 2 presenta pubescencia abaxial en la axila de las nervaduras principal y secundaria (*Figura 6*).

Las características morfológicas del cultivar Kanva 2 (*Anexo 2*) corresponden a la descripción de *Morus alba* según cinco claves taxonómicas estudiadas (Cifuentes y Sohn, 1998; Kitahara *et al*, 2001; Li, 2007; Nepal, 2008; Sánchez, 2002); sin embargo, otros autores señalan que este cultivar está relacionado con *Morus indica*, un taxón poco aceptado que se identifica como sinonimia de *Morus alba* (Li, 2007; Nepal, 2008).

Tabla 5. Criterios para la selección de los cultivos de *M. alba* cultivar Kanva 2 y *M. australis* cultivar Taig song como fuente de material vegetal para cultivo *in vitro*.

Criterios evaluados	Fincas (municipio)		
	El Madroño (El Tambo)	La Isabela (Piendamó)	La Aurora (Piendamó)
<b>Aspecto de las plantas en la poda de cosecha</b>	Color amarillo, hongos foliares extendidos	Color verde, hongos foliares escasos	Color verde, hongo foliar escaso o ausente
<b>Altura en la poda de cosecha</b>	130 cm	150 cm	160 cm
<b>Manejo agronómico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poda: Cosecha</li> <li>• Deshierba: 20 días después de la poda.</li> <li>• Fertilización: compost</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poda: Cosecha</li> <li>• Deshierba: 20 días después de la poda.</li> <li>• Fertilización: abono productivo, Urea</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poda: Cosecha</li> <li>• Deshierba: 15-20 días después de la poda</li> <li>• Fertilización: gallinaza cada poda. Cal cada año.</li> </ul>
<b>Producción hojas de morera (Kg/ha)</b>	500 Kg/0,25 ha	600 Kg/0,25 ha	800 Kg/0,25 ha
<b>Producción capullos (kg/caja de gusanos)</b>	51,3	64	48,6
<b>Calidad del capullo</b>	Extra	Súper extra	Extra a súper extra
<b>Crías por año</b>	3	4	8

Tabla 6. Características morfológicas de *M. alba* cultivar Kanva 2 y *M. australis* cultivar Taig song.

CARACTERÍSTICA	Cultivar		
	Kanva 2	Taig song	
Inflorescencia	Expresión sexual	Flores femeninas y flores perfectas	Flores masculinas
	Tamaño	En promedio 1 cm	En promedio 1,75 cm
Flores	Número estambres	3 en flores perfectas, no siempre visibles	4 estambres
Estípulas	longitud	1 cm aprox.	1,4 cm aprox.
Hojas	Forma	Hojas enteras ligeramente cordadas a ovaes	Hojas enteras cordadas, en ocasiones bi y trilobuladas
	Ápice	Ligeramente acuminado	Ápice pronunciado, aprox. del doble de longitud que en Kanva 2
	Margen	Aserrado	Aserrado con dentadura pronunciada
	Base	Acuñada ligeramente cordada	Cordada
	Textura	Membranosa	Coriácea
	Color hoja madura	Verde brillante	Verde oscuro
	Pubescencia abaxial	Abundante en las axilas de las venas	Escasa, esparcida a lo largo de las venas
Yemas	Tamaño	En promedio 3,5 mm	En promedio 6 mm
	Forma	Triangulo regular	Triangulo regular en ocasiones con inclinación lateral

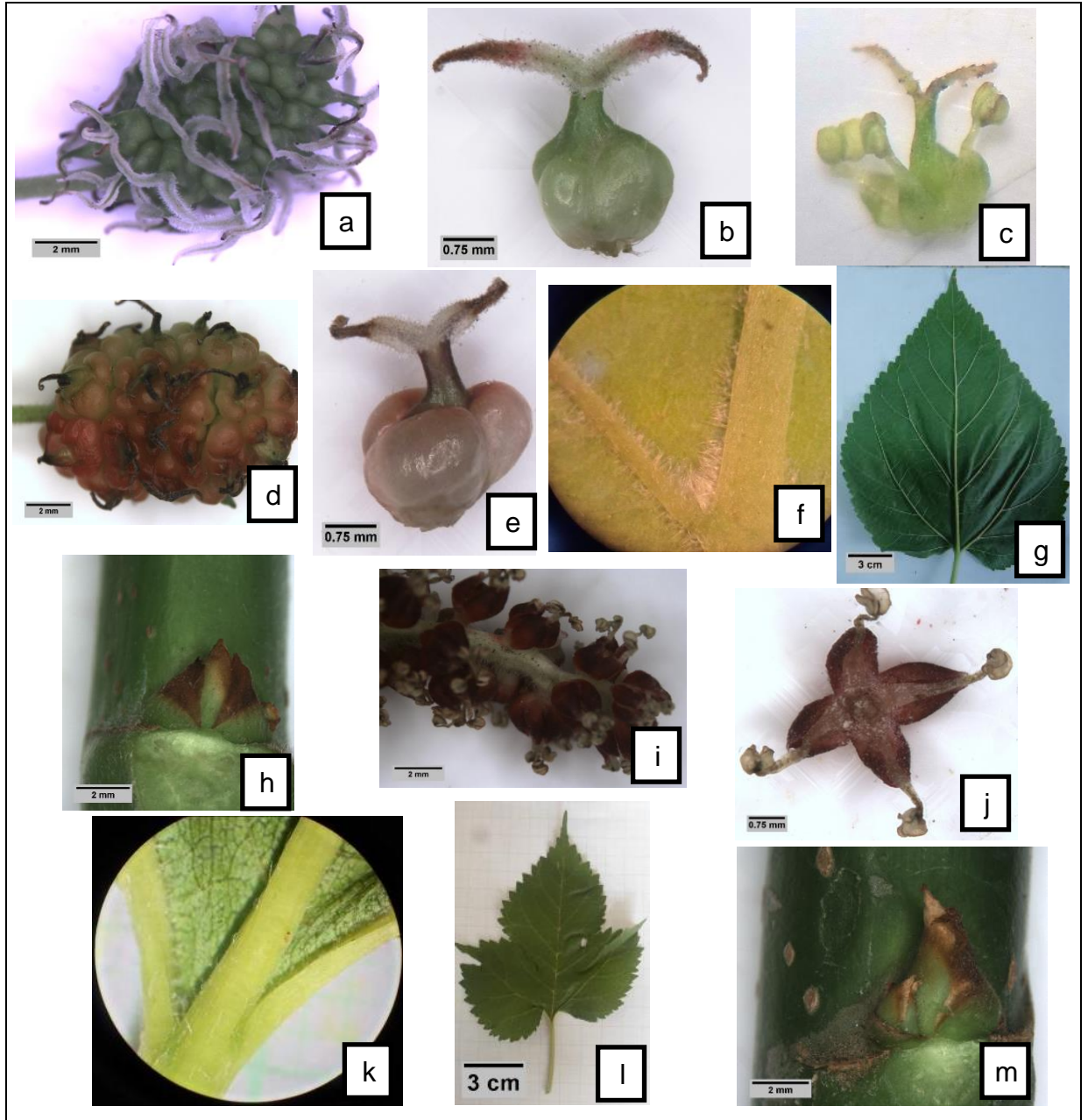


Figura 6. Características morfológicas de los cultivares de morera. ***M. alba* cultivar Kanva 2**: a) inflorescencia, b) flor femenina, c) flor perfecta, d) infrutescencia, e) fruto, f) pubescencia abaxial en la axila de la nervadura de la hoja, g) hoja entera, h) yema axilar; ***M. australis* cultivar Taig song**: i) inflorescencia, j) flor masculina, k) pubescencia abaxial ausente en axila de la nervadura de la hojas, l) hoja lobulada, m) yema axilar con inclinación lateral.



Rao y Jarvis (1986) definen la presencia de un estilo connado como la característica clave que diferencia a *Morus indica* de *Morus alba*, misma que presenta el ejemplar colectado del cultivar Kanva 2, además de otras características que lo relacionan con *Morus indica* como una hoja con ápice acuminado o caudado y margen serrado, aunque también presenta características que corresponden con *Morus alba* tales como: estilo glabro, limbo de textura suave y pubescencia abaxial en las axilas de las nervaduras; estas características son menos relevantes para la identificación según los mismos autores.

Kanva 2 es el único cultivar de *Morus indica* que se ha extendido para el uso de la sericultura en Colombia (Cifuentes y Sohn, 1998), también conocida como Mysore 5 (Central Silk Board, 1997, 1999). El cultivar Kanva 2 es la fuente principal de alimento del gusano en las fincas sericultoras de Colombia, debido a características tales como: rendimiento, resistencia, adaptación al clima y alto porcentaje de enraizamiento a partir de estacas (Cifuentes, 1995).

*Morus australis* es la especie que presenta mayor similitud con el cultivar Taig song según la comparación de la descripción realizada (

Anexo 3) con las descripciones proporcionadas por el libro Flora de China (Li, 2007), en Colombia este cultivar es el único que se relaciona con *Morus formosensis* Hotta, que bajo la taxonomía actual es sinonimia de *M. australis* (García *et al*, 2000; Gonzáles y Gómez, 1997). El cultivar Taig song se diferencia claramente de otras especies del género *Morus* como *M. trilobata*, la cual tiene hojas profundamente lobuladas, *M. mongolica* que siempre presenta puntas subuladas en el margen o ápice de la hoja o *M. cathayana* que presenta hojas orbiculares y pubescencia abaxial muy densa (Li, 2007); respecto a otras especies la diferencia es menor: con *M. alba* comparten similitudes en la estructura básica de las hojas, pero algunos caracteres son más pronunciados en el cultivar Taig song como el ápice acuminado, el margen aserrado y la base cordada.

Las claves taxonómicas para identificar especies del género *Morus* se basan en las estructuras reproductivas femeninas como la presencia o ausencia de estilo y su longitud, y no en las estructuras reproductivas masculinas ya que no suelen ser exclusivas de una sola especie (Li, 2007; Rao y Jarvis, 1986), según Rao y Jarvis (1986) cultivares de *M. indica* como la kanva 2 suelen presentar una expresión sexual femenina para facilitar su identificación, sin embargo es difícil identificar especímenes que presentan únicamente flores masculinas, por lo que la descripción realizada al cultivar Taig song fue comparada con las descripciones dadas en la Flora de China (Li, 2007) para aproximarse a la especie a la cual pertenece este cultivar.

### **5.1.3. Selección de las plantas donadoras.**

Las plantas de morera (*M. alba* cultivar Kanva 2 y *M. australis* cultivar Taig song) seleccionadas como fuente de explantes para la propagación *in vitro* presentan las siguientes características agronómicas: ausencia de patógenos, tallos de tres meses de edad con una altura y grosor de aproximadamente 120 cm de altura y 1 cm de diámetro respectivamente y hojas de color verde brillante.

La ausencia de enfermedades causadas por hongos o bacterias en las plantas donadoras de explantes se tuvo en cuenta como una característica que facilita la desinfección y el establecimiento del cultivo *in vitro*; además las otras características de los tallos colectados (edad, longitud y grosor) fueron tenidas en cuenta para garantizar que la planta donadora presentara el mejor comportamiento agronómico, el cual podría ser un indicador de buen estado fisiológico del material vegetal destinado a la propagación *in vitro*, según Cifuentes y Sohn (1998) el mejor comportamiento agronómico se alcanza a los tres meses de edad lo que se manifiesta con abundante producción de follaje, tallos vigorosos, buen porte y color verde brillante de las hojas, indicador de que han alcanzado la madurez requerida para la nutrición del gusano de seda.

El material vegetal colectado de las plantas madre seleccionadas en las fincas La Aurora y La Isabela fue dividido en dos grupos para evaluar la mejor fuente de explantes: el grupo que fue destinado a la obtención de brotes bajo condiciones ambientales controladas, presentó mejores resultados en cuanto a porcentajes de desinfección y respuesta del explante al cultivo *In vitro*, a diferencia del grupo que fue destinado directamente a pruebas de desinfección, en donde no se logró obtener de manera conjunta explantes asépticos y viables.

#### **5.1.4. Evaluación de la brotación de yemas en condiciones ambientales controladas.**

La prueba de Shapiro-Wilk ( $p > .05$ ) y la prueba de Levene ( $p > .05$ ) señalaron que los datos no presentaron simultáneamente distribución normal y homogeneidad de varianzas, por lo cual se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, la cual indicó que la posición de la estaca (basal, central o apical) en la rama influye en el tiempo transcurrido para la brotación ( $X^2(2)=23.517$ ,  $p=.000$ ), longitud de los brotes ( $X^2(2)=42.086$ ,  $p=.000$ ), diámetro del tallo del brote ( $X^2(2)=20.998$ ,  $p=.000$ ) y en el número de brotes por estaca ( $X^2(2)=34.663$ ,  $p=.000$ ); es decir cuánto más apical sea la posición de la estaca menor será el tiempo transcurrido para la brotación de las yemas, menor será la longitud y el diámetro en el tallo de los brotes y mayor será el número de brotes por estaca. Se encontró que los brotes de las estacas basales y apicales de *M. alba* cultivar Kanva 2 son significativamente diferentes en todas las variables evaluadas y en el caso de las estacas centrales los brotes presentaron características intermedias (*Tabla 7*).

Tabla 7. Resultados de la prueba de rangos de Kruskal-Wallis para determinar la influencia de la posición de la estaca sobre cuatro variables evaluadas en brotes de *M. alba* cultivar Kanva 2 desarrollados en condiciones ambientales controladas.

Características de los brotes	Rangos promedio según la posición de la estaca en la rama		
	Basal	Central	Apical
Número de brotes por estaca	15,15a	35,20b	41,15b
Longitud del brote	47,18a	30,75b	11,80c
Diámetro del tallo del brote	43,88a	25,90b	19,45b
Tiempo transcurrido para la brotación	39,85a	36,45a	15,20b

Los valores representan los rangos promedios obtenidos para cada tratamiento. Los rangos promedio seguidos por la misma letra en una fila no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis, paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 19.0.

Las estacas apicales y centrales del cultivar Kanva 2 presentan 2 brotes por estaca, mientras que las basales solo presentan 1 brote por estaca de acuerdo a la información proporcionada por la mediana y rangos intercuartílicos (*Tabla 8*), sin embargo de acuerdo con los estimadores (media y el error estándar) (*Anexo 1*) el número de yemas que brotan en estacas apicales es mayor que en las estacas centrales, variando de 2 a 3 en un periodo aproximado de 7 días, mientras que en las estacas centrales varía entre 1 y 2 en un periodo de 9 días, en las estacas basales usualmente solo brota 1 yema por estaca en un periodo aproximado de 10 días y en algunos casos ninguna de las yemas de las estacas basales brotan.

Los tallos de los brotes obtenidos de estacas basales alcanzaron a los 21 días un diámetro y una longitud mayor que el observado en los brotes provenientes de las estacas localizadas en la posición central y apical de las ramas, a pesar de brotar aproximadamente el mismo día que las yemas de las estacas centrales, o incluso brotar de 2 a 3 días después que las yemas de las estacas apicales (*Tabla 8*).

Tabla 8. Influencia de la posición de la estaca en la rama sobre cuatro variables evaluadas en brotes de *M. alba* cultivar Kanva 2, transcurridos 21 días de desarrollo en condiciones ambientales controladas.

Características de los brotes	Posición de la estaca en la rama		
	Basal	Central	Apical
Número de brotes por estaca	1,00 (1,00 a 1,00)	2,00 (2,00 a 2,00)	2,00 (2,00 a 2,00)
Longitud del brote (mm)	38,57 (34,92 a 44,05)	30,93 (29,54 a 33,66)	24,70 (22,83 a 27,93)
Diámetro del tallo del brote (mm)	2,16 (2,08 a 2,39)	2,02 (1,94 a 2,10)	1,98 (1,85 a 2,06)
Tiempo transcurrido para la brotación (días)	10,75 (9 a 12)	9,5 (7,88 a 10,67)	6,67 (6,33 a 7,25)

Veinte estacas por tratamiento. Los datos representan la mediana seguida del rango intercuartílico (Q1 a Q3).

La morera presenta yemas que se encuentran en estado de latencia o dormancia, esta latencia se puede adquirir y reforzar gradualmente (Universidad Politécnica de Valencia, 2003) como es el caso de las yemas de las estacas basales que son más viejas que sus contrapartes las apicales, su estado de latencia es difícil de romper e incluso imposible, lo cual explica porqué las yemas ubicadas en la zona basal de las ramas tardan en brotar. Además, entre las yemas de una misma estaca basal puede existir una relación de dominancia, un brote se desarrolla antes que las otras yemas de las estacas basales se activen y éste posiblemente ejercerá un control hormonal evitando que las otras yemas rompan su estado de latencia (Bolaños, 2001), lo cual podría explicar porqué en promedio solo una yema brota en las estacas basales. En el caso de las yemas de las estacas centrales, estas no han logrado adquirir un estado de latencia profundo (pre-latencia), por lo que es más fácil de romper (Universidad Politécnica de Valencia, 2003).

La yema que brota primero en las estacas basales ejerce un efecto de dominancia sobre el resto de las yemas, manteniendo su estado de latencia y controlando así el número de sumideros, de modo tal que asegura que todos los recursos sean destinados únicamente a su propio desarrollo (Bolaños, 2001), por esta razón posiblemente los brotes de las estacas basales alcanzan en promedio longitudes y grosores mayores. Los primeros brotes en las estacas centrales y apicales probablemente no pueden ejercer el mismo control dado que el estado de latencia de las yemas en estas zonas es menos profundo (Universidad Politécnica de Valencia, 2003), por lo cual los recursos se dividen entre 2 o más brotes en cada estaca y estos alcanzan en promedio longitudes y grosores menores.

Las estacas centrales son las más aptas como fuente de brotes para el cultivo *In vitro* de Kanva 2, porque presentan un número de brotes similar al de las estacas apicales pero sus brotes presentan en promedio una longitud significativamente mayor y un mejor aspecto a pesar de brotar de manera tardía; las estacas basales producen brotes con mejores características en cuanto a longitud y diámetro, sin embargo al producir el menor número de brotes, las estacas basales no se consideran adecuadas como fuente de explantes (*Tabla 8*). Estos resultados concuerdan con Cifuentes y Sohn (1998) quienes recomiendan utilizar la parte central de las ramas para la propagación convencional, ya que aunque la parte apical de las ramas brota rápidamente el crecimiento posterior es deficiente, y en la parte basal de las ramas la brotación y crecimiento de las yemas es lento y deficiente.

Las estacas del cultivar Taig song presentaron dificultades para inducir la brotación de yemas, debido a que si bien mostraron signos de crecimiento rápido, en la mayoría de los casos las yemas se secaron antes de brotar completamente; por lo que no se pudieron obtener brotes de manera eficiente, sin embargo los pocos brotes que se lograron obtener se emplearon para una única prueba de desinfección.

## **5.2. DESINFECCIÓN**

### **5.2.1. Segmentos nodales de *M. alba* cultivar Kanva 2 provenientes de campo**

La inmersión de los segmentos nodales lignificados de *M. alba* cultivar Kanva 2 en concentraciones de hipoclorito de sodio entre 0,5% y 1,5% por 20 min no logro eliminar los microorganismos (hongos y bacterias) presentes en los segmentos nodales provenientes de campo y causaron la oxidación de todos los explantes, por lo tanto no se probaron concentraciones mayores a 1,5% (*Tabla 9*).

Según Levitus *et al* (2004) el hipoclorito de sodio es uno de los agentes desinfectantes más empleados en cultivo *in vitro*, en solución libera cloro molecular que se combina con agua para formar ácido hipocloroso, aunque se desconoce su mecanismo de acción exacto, se postula que se basa en la inhibición de reacciones enzimáticas por la acción oxidativa del ácido hipocloroso sobre los grupos SH de las proteínas entre otros componentes celulares (Vignoli, 2002; Universidad de Pamplona, 2008).

Cortes y Perea (2001) lograron la desinfección de segmentos nodales de morera empleando hipoclorito de sodio al 1% por 10 min, pero a diferencia del presente estudio, su fuente de explantes fueron plantas establecidas en condiciones ambientales controladas; además Salas *et al* (2004, 2005) utilizaron plantas de morera establecidas en campo, logrando la desinfección con hipoclorito de sodio al 1% por 15-20 min, sin embargo emplearon yemas apicales en lugar de segmentos nodales.

En esta investigación, como alternativa al hipoclorito de sodio fueron empleadas sales de amonio cuaternario que, en concentraciones entre 0.25 y 1%, lograron disminuir drásticamente la presencia de hongos en los cultivos, pero no la de bacterias (*Tabla 9*).

Tabla 9. Efecto de los tratamientos aplicados para la desinfección de segmentos nodales de *M. alba* cultivar Kanva 2 provenientes de campo.

Ensayo	Etanol	NaClO	NR <sup>4+</sup>	T°	Tipo de Contaminación				
					NC	Hongo	Bacteria	Hongo y bacteria	
1	70% x 20 min	0,5% x 20 min	-----	-----	10%	20%	70%	0%	
		1% x 20 min	-----	-----	10%	10%	80%	0%	
		1,5% x 20 min	-----	-----	10%	10%	80%	0%	
2	70% x 20 min	-----	0,25% x 20 min	-----	10%	0%	90%	0%	
		-----	0,5% x 20 min	-----	10%	0%	90%	0%	
		-----	1% x 20 min	-----	30%	0%	70%	0%	
3	70% x 10 min	-----	1% x 10 min	40°C x 15 min	40%	40%	20%	0%	
		-----		40°C x 30 min	40%	60%	0%	0%	
		-----		40°C x 60 min	40%	20%	0%	0%	
		-----		50°C x 15 min	100%	0%	0%	0%	
		-----		50°C x 30 min	60%	40%	0%	0%	
		-----		50°C x 60 min	80%	20%	0%	0%	
		-----		-----	20%	80%	0%	0%	
4	70% x 5 min	-----	1% x 20 min	45°C x 45 min	20%	20%	60%	0%	
	70% x 10 min	-----			20%	60%	20%	0%	
	70% x 15 min	-----			20%	0%	60%	20%	
	70% x 5 min	-----			0%	40%	20%	40%	
	70% x 10 min	-----			50°C x 15 min	100%	0%	0%	0%
	70% x 15 min	-----			80%	20%	0%	0%	

Los porcentajes de oxidación fueron del 100% en todos los tratamientos. Ensayos 1 y 2: 10 repeticiones por tratamiento; Ensayos 3 y 4: 5 repeticiones por tratamiento; Ensayo 1  $\chi^2$  (gl=4, N=30): 0.587,  $p > 0.05$ ; Ensayo 2  $\chi^2$  (gl=2, N=30): 01.920,  $p > 0.05$ ; Ensayo 3  $\chi^2$  (gl=12, N=35): 15.846,  $p > 0.05$ ; Ensayo 4  $\chi^2$  (gl=15, N=30): 29.857,  $p < 0.05$ ; NaClO: hipoclorito de sodio, NR<sup>4+</sup>: amonio cuaternario, T°: Termoterapia, NC: no contaminado; líneas punteadas (-----): no se aplicó en ese tratamiento.



Las sales de amonio cuaternario son agentes bactericidas, fungicidas y virucidas que actúan alterando la permeabilidad de la membrana celular y desnaturalizando las proteínas (Vignoli, 2002; Universidad de Pamplona, 2008). Según Vignoli (2002), las sales actúan fundamentalmente sobre bacterias Gram positivas, por lo que probablemente las bacterias asociadas a la morera sean Gram negativas, además, las ramas de morera presentan aberturas naturales (lenticelas y estomas) donde no penetra el agente desinfectante y en estos sitios se podrían establecer las bacterias (Cassells, 1991; Jáñez, 2003).

Los patógenos albergados en los tejidos internos o aberturas naturales pueden ser eliminados empleando dos métodos: la quimioterapia, que es el uso de productos químicos - aplicados al explante directamente o incluidos en el medio de cultivo - que alteran el metabolismo de virus y bacterias (CIAT, 1982); y la termoterapia, que es la aplicación de calor - mediante agua, aire o vapor - a temperaturas y periodos de tiempo letales para virus y bacterias pero no para el explante o la planta donadora (Martínez, 1987).

La termoterapia fue empleada para eliminar las bacterias alojadas en las lenticelas de los segmentos nodales de morera, debido a que es un método que, a diferencia de la quimioterapia, no emplea sustancias químicas que puedan ocasionar variación somaclonal en el explante o que pudieran permanecer como residuos en las plántulas regeneradas (Levitus *et al*, 2004), aspectos que no van con el propósito de la propagación *In vitro* y la certificación GOTS, para la seda producida de manera orgánica en el Cauca respectivamente.

La termoterapia, con su capacidad de eliminar las bacterias de las lenticelas, se combinó con las sales de amonio cuaternario (1% x 20 min) y etanol (70% x 10 min) que demostraron ser eficaces eliminando hongos y de esta manera se logró la desinfección completa del explante (*Tabla 9*). Temperaturas por encima de 50

°C presentaron porcentajes de desinfección del 60% al 100% incluso en periodos cortos (15 min), mientras que a 40°C y 45°C no se obtuvieron porcentajes de desinfección mayores que 40% incluso en periodos de hasta 60 min (*Tabla 9*); sin embargo ningún explante presentó respuesta al medio de cultivo (en términos de desarrollo de las yemas) con ninguno de los tratamientos aplicados.

La termoterapia normalmente se emplea para eliminar virus, pero también se ha empleado para la eliminación de bacterias en explantes de caña de azúcar (Salazar y Surga, 1998), sin embargo los segmentos nodales de *M. alba* cultivar Kanva 2 evaluados en el estudio fueron menos resistentes a este método, puesto que todos se oxidaron bajo condiciones más moderadas de temperatura y tiempo de aplicación que las empleadas en caña de azúcar (*Tabla 9*).

La desinfección de segmentos nodales provenientes de campo se logró al aplicar los agentes desinfectantes durante periodos de tiempo largos y concentraciones altas pero ocasionaron viabilidad nula del explante y un porcentajes de oxidación del 100% (*Tabla 9*), esto debido posiblemente a los efectos adversos que estos agentes pueden ocasionar: deshidratación de los tejidos por el etanol (Ruiz *et al*, 2009), desnaturalización de las proteínas por la termoterapia e inhibición de la síntesis de giberelinas por las sales de amonio cuaternario (Dennis *et al*, 1965); además al aplicar condiciones más moderadas (concentraciones, temperaturas y tiempos de exposición mínimos) no se logró disminuir la oxidación y por el contrario la contaminación aumentó.

Las condiciones ambientales en campo (lluvia, corrientes de aire, esporas, insectos entre otros) favorecen la proliferación de microorganismos en las plantas madre y ocasionan un aumento de los hongos y bacterias asociados al explante, por lo tanto se incrementan los porcentajes de contaminación en el cultivo *In vitro* al usar material proveniente de esta fuente (Levitus *et al*, 2004; Salazar y Surga, 1998), por lo que es probable que la cantidad de microorganismos asociados a los

segmentos nodales provenientes de campo fuese lo suficientemente alta, como para que no se encontraran tiempos de aplicación y concentraciones intermedias de los agentes que lograran la desinfección de explantes, sin oxidarlos en el proceso (*Tabla 9*).

Las plantas destinadas para el cultivo *In vitro* deberán crecer en condiciones de invernadero para disminuir los porcentajes de contaminación que se generan en material expuesto a condiciones de campo (Levitus *et al*, 2004), de hecho los pasos previos para reducir los porcentajes de contaminación en la fuente del material vegetal, deberían ser la primera etapa de todo trabajo para la propagación *In vitro*, pero esta etapa es a menudo omitida, algunas veces con consecuencias adversas (George *et al*, 2008a) como ocurrió en esta investigación con los segmentos nodales provenientes de campo, los cuales no habían pasado por una etapa de preparación previa; esto sucedió debido a que en la mayoría de reportes sobre cultivo *In vitro* se omite o subestima la importancia de la etapa de selección y preparación del material vegetal, y los resultados se enfocan en las etapas posteriores (multiplicación, elongación, enraizamiento y aclimatación)

El tratamiento de desinfección que presentara los mejores resultados en segmentos nodales lignificados de Kanva 2 se planeaba aplicar sobre el material vegetal del cultivar Taig song debido a que la disponibilidad de solo 3 plantas donantes no permitía realizar muchos ensayos, sin embargo al no lograr la desinfección de los segmentos nodales lignificados de Kanva 2 se descartó el uso de material proveniente de campo y se optó por emplear una fuente alternativa de explantes que proporcionara material vegetal más limpio.

### **5.2.2. Segmentos nodales provenientes de brotes en condiciones ambientales controladas.**

El método para obtener brotes bajo condiciones ambientales controladas, a partir de estacas colectadas en campo, resultó eficiente para *M. alba* cultivar Kanva 2, debido a que al usar estos brotes como fuente de explantes, en lugar de las plantas establecidas en campo, se logró la desinfección y el establecimiento de segmentos nodales no lignificados (Tabla 10) estos resultados corroboran la efectividad del método propuesto por Cholo y Delgado (2011).

El tratamiento con etanol (70%) por 1 min, seguido de peróxido de hidrógeno (2%) por 2 min e hipoclorito de sodio (2%) por 10 min presentó en los ensayos 6 y 7 los mejores resultados para la desinfección de los segmentos nodales no lignificados de Kanva 2, con porcentajes de desinfección de 60% - 80% y porcentajes de respuesta del 100% - 80% respectivamente; respuesta que nunca se logró con segmentos nodales provenientes de campo. Las concentraciones y los tiempos de aplicación de hipoclorito de sodio superiores al 2% y 10 min ocasionaron la oxidación de los explantes, mientras que al emplear concentraciones y tiempos inferiores al 2% y 10 min no se lograron porcentajes de desinfección adecuados (Tabla 10).

El tratamiento anterior también fue aplicado a los pocos brotes de *M. australis* cultivar Taig song que se lograron inducir en condiciones ambientales controladas, como resultado se obtuvo un porcentaje de desinfección del 80% y 60% de respuesta.

Salazar y Hoyos (2007) lograron la desinfección de segmentos nodales de ñame, desarrollados en condiciones de invernadero, empleando peróxido de hidrógeno e hipoclorito de sodio en concentraciones y tiempos de aplicación similares a los utilizados en esta investigación, además Cholo y Delgado (2011), lograron con brotes de morera obtenidos en condiciones de invernadero la desinfección de

segmentos nodales no lignificados con hipoclorito de sodio al 1% por 15 min, sin emplear peróxido de hidrógeno; lo cual se debió probablemente al empleo de brotes desarrollados bajo condiciones más asépticas.

Tabla 10. Efecto de los tratamientos aplicados para la desinfección de segmentos nodales, obtenidos de brotes de *M. alba* cultivar Kanva 2 en condiciones ambientales controladas.

Ensayo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NaClO	Tipo de Contaminación				Respuesta
			NC	Hongo	Bacteria	Hongo y Bacteria	
5	1% x 2 min	-----	0%	0%	17%	83%	100%
	2% x 2 min	-----	0%	0%	0%	100%	100%
6	2% x 2 min	0,5% x 10 min	20%	20%	40%	20%	100%
		1% x 10 min	20%	40%	40%	0%	100%
		2% x 10 min	60%	0%	40%	0%	100%
		5% x 10 min	40%	0%	40%	20%	0%
7	2% x 2 min	2% x 10 min	80%	20%	0%	0%	80%
		2% x 15 min	60%	40%	0%	0%	40%
		3% x 10 min	60%	40%	0%	0%	20%
		3% x 15 min	100%	0%	0%	0%	20%

Ensayo 5: 6 repeticiones por tratamiento; Ensayo 6 y 7: 5 repeticiones por tratamiento; Ensayo 5  $\chi^2$  (gl=1, N=12): 1.091,  $p > 0.05$ ; Ensayo 6  $\chi^2$  (gl=9, N=20): 7.238,  $p > 0.05$ ; Ensayo 7  $\chi^2$  (gl=3, N=20): 2.933,  $p > 0.05$ ; previamente se aplicó etanol 70% por 1 min en todos los tratamientos. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno, NaClO: hipoclorito de sodio, NC: No contaminado; líneas punteadas (----): no se aplicó en ese tratamiento.

En este estudio los tratamientos que sólo emplearon etanol y peróxido hidrógeno no fueron eficientes para eliminar hongos y bacterias, no obstante los explantes mostraron una respuesta del 100%, en cuanto al desarrollo de las yemas in vitro durante el las cinco semanas de observación (Tabla 10).

El mecanismo de acción del peróxido de hidrógeno se basa en la producción de iones hidroxilo y otras especies reactivas de oxígeno que actúan oxidando moléculas esenciales de los microorganismos - lípidos, proteínas y ácidos nucleicos - (Sociedad Catalana de Farmacia Clínica, 2005; Labas *et al*, 2008).

El peróxido de hidrógeno tiene un amplio espectro de acción sobre hongos, virus y bacterias; sin embargo su tiempo de acción es corto (se degrada rápidamente), algunas bacterias Gram positivas y microorganismos aerobios son menos sensibles a este (por la presencia de catalasas capaces de degradar el peróxido), y actúa solo como bacteriostático en concentraciones menores al 3%; debido a esto en cultivo *In vitro* de segmentos nodales se emplea en conjunto con otros desinfectantes como el hipoclorito de sodio (Acosta, 2000; Salazar y Hoyos, 2007).

Los estudios que emplean plantas de morera establecidas en campo como material de partida usualmente logran la desinfección empleando etanol (70%) por 1 min, seguido de cloruro de mercurio (0,1%) por 1 a 15 min (Chitra y Padmaja, 1999; Tewari *et al*, 1999; Balakrishnan *et al*, 2009). El cloruro de mercurio se emplea como último recurso porque es un compuesto tóxico y difícil de remover del explante (Levitus *et al*, 2004).

El material de partida proveniente de plantas donadoras de explantes establecidas en condiciones de invernadero, presenta menor cantidad de microorganismos y se hace innecesario el uso de sustancias como el cloruro de mercurio (Levitus *et al*, 2004). Al no disponer de plantas establecidas en invernadero resulta recomendable emplear el método propuesto por Cholo y Delgado (2011), el cual permite obtener brotes con contaminación mínima que facilitan la desinfección de los explantes para su introducción en el cultivo *In vitro*.

### 5.3. ESTABLECIMIENTO

Los explantes de *M. alba* cultivar Kanva 2 que se lograron establecer exitosamente en medio MS suplementado con BAP al 0,25 mg/L mostraron signos de brotación al quinto día (*Figura 7*), sin embargo el crecimiento posterior fue deficiente ya que se formaron hojas vitrificadas y callo en la base, que con el tiempo se extendió a toda la plántula (*Figura 8*); en comparación con BAP al 0,15 mg/L la respuesta de los explantes fue evidente a los 12 días, presentando mejor aspecto: tallos vigorosos, hojas con el aspecto típico del cultivar y menor formación de callo en la base (*Figura 9*).

Además, se observó la formación de raíces en algunos brotes al retirar el estímulo luminoso durante 7 días, sin necesidad de emplear un medio de composición destinado para el enraizamiento o adicionar auxinas (*Figura 10*). Tewari *et al* (1999) y Sajeevan *et al* (2011) también observaron la formación espontánea de raíces en un medio de cultivo destinado a la multiplicación y la elongación.

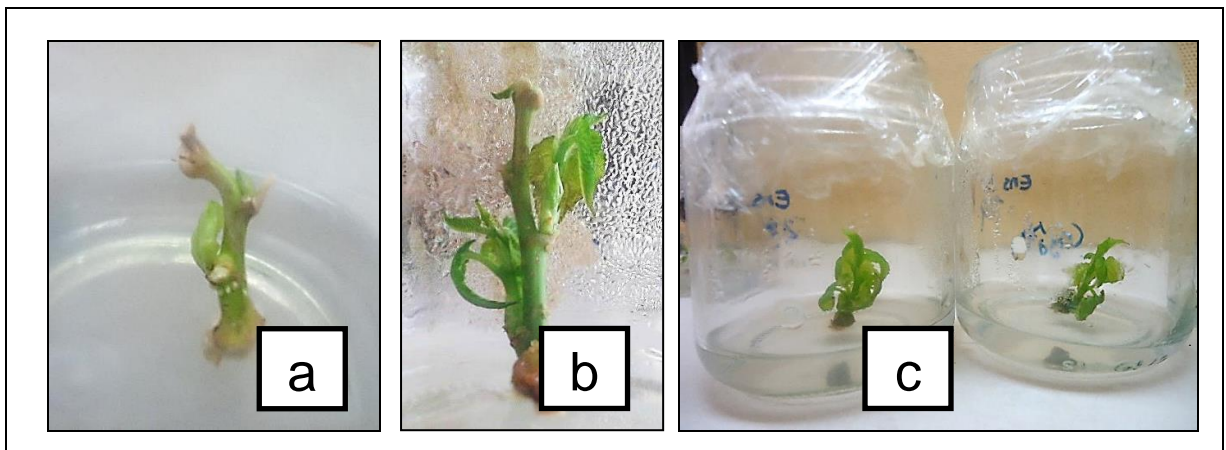


Figura 7. Segmentos nodales no lignificados de *M. alba* cultivar Kanva 2 en diferentes estados de desarrollo en medio de cultivo MS suplementado con 0,25 mg/L de BAP. A) Día 5, brotación de yemas. B) Día 12, desarrollo de hojas. C) Día 30, subcultivo de brotes.

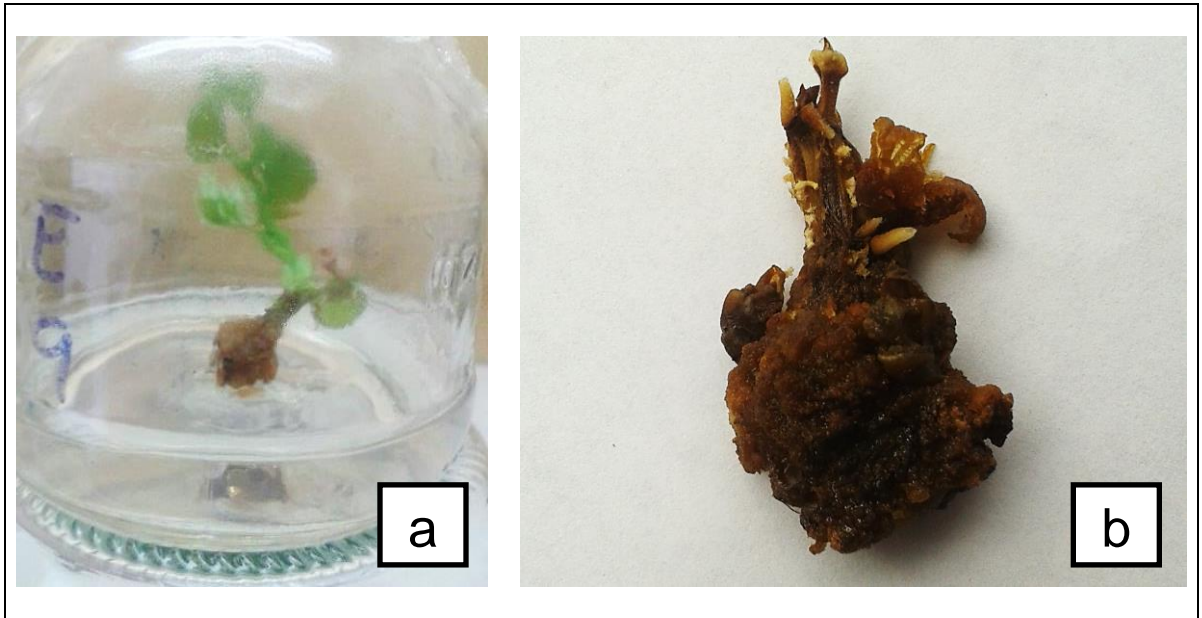


Figura 8. Formación de callo en plántulas de *M. alba* cultivar Kanva 2: a) Inicio de la formación de callo. b) Plántula invadida por el callo.



Figura 9. Segmentos nodales no lignificados de *M. alba* cultivar Kanva 2 en medio de cultivo MS suplementado con 0,15 mg/L de BAP.



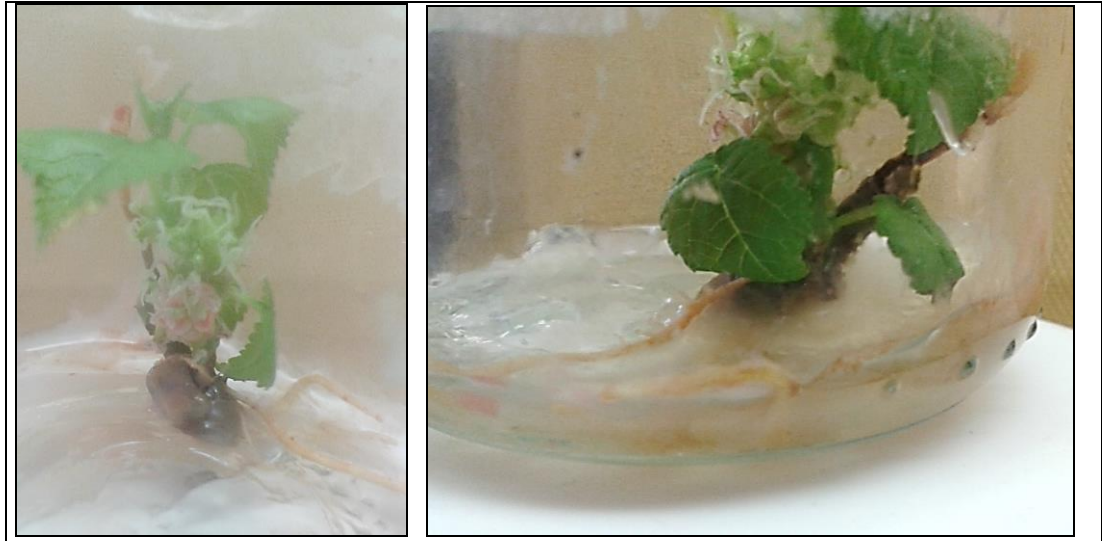


Figura 10. Vástagos de *M. alba* cultivar Kanva 2 enraizados en medio MS con 0,15 mg/L de BAP y condiciones de baja luminosidad.

Los explantes de Taig song se desarrollaron adecuadamente en Medio MS suplementado con 0,25 mg/L de BAP sin mostrar signos de vitrificación a diferencia de los explantes de Kanva 2 en un medio de cultivo con la misma composición. Además en *M. australis* cultivar Taig song se observó la formación de un mayor número de brotes debido probablemente a la presencia de los múltiples nodos del explante (Figura 11).

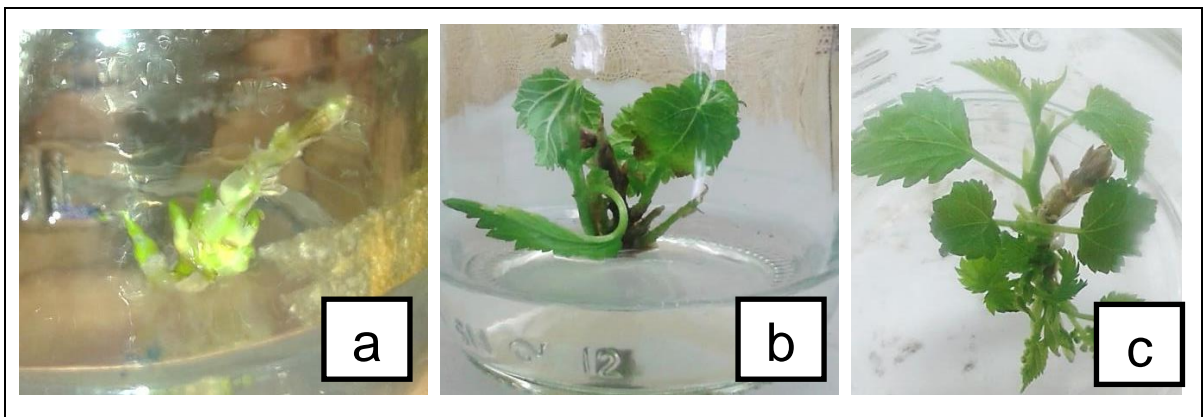


Figura 11. Segmentos nodales no lignificados de *M. australis* cultivar Taig song en diferentes estados de desarrollo en medio de cultivo MS suplementado con 0,25 mg/L de BAP: A) Formación de brotes múltiples. B) Desarrollo de hojas. C) Vástago con 30 días en desarrollo.

## 6. CONCLUSIONES

Las plantas donadoras de explantes seleccionadas en campo pertenecen a dos cultivares y especies distintas, que bajo la taxonomía actual se identifican como *Morus alba* cultivar Kanva 2 y *Morus australis* cultivar Taig song.

El material vegetal que se desarrolla en condiciones ambientales controladas presenta niveles de contaminación inferiores al material que se desarrolla en campo, por lo tanto es una mejor fuente de explantes para el cultivo *in vitro* de morera.

Las estacas de *M. alba* cultivar Kanva 2 establecidas en condiciones ambientales controladas para la inducción de brotes deben provenir de la parte central de las ramas, debido a que éstas presentan un número adecuado de brotes por estaca con un tamaño apropiado para ser empleados como fuente de explantes para el cultivo *in vitro*.

El método de Cholo y Delgado (2011) para inducir la brotación de yemas en condiciones ambientales controladas no permitió obtener brotes de *M. australis* cultivar Taig song de manera eficiente debido a que en su mayoría las yemas se secaron u oxidaron antes de brotar.

Los segmentos nodales no lignificados de *M. alba* cultivar Kanva 2 y *M. australis* cultivar Taig song provenientes de brotes desarrollados en condiciones ambientales controladas mostraron bajos porcentajes de contaminación y altos porcentajes de respuesta, comparados con los segmentos nodales lignificados provenientes de campo, cuya respuesta fue nula y en ningún tratamiento se logró su desinfección sin ocasionar simultáneamente la oxidación del explante.

El tratamiento de desinfección que presentó los mejores resultados en segmentos nodales no lignificados de *M. alba* cultivar Kanva 2, en cuanto a mayores porcentajes de desinfección y respuesta adecuada, apariencia y desarrollo de las yemas fue: etanol al 70% por 1 min seguido de peróxido de hidrógeno al 2% por 2 min e hipoclorito de sodio 2% por 10 min.

## 7. RECOMENDACIONES

Identificar otros cultivares de morera (*Morus* spp.) disponibles en el departamento del Cauca mediante descripciones botánicas e identificación taxonómica.

Seleccionar cultivos pertenecientes a fincas que realicen buenas prácticas de manejo agronómico para garantizar que las plantas de morera donadoras de explantes estén en buen estado fisiológico.

Emplear plantas de morera establecidas en condiciones ambientales controladas como fuente de explante para el establecimiento de un cultivo *In vitro*.

Emplear como fuente de explantes brotes desarrollados en condiciones ambientales controladas o material previamente establecido en invernadero.

Transportar las ramas de morera colectadas en campo debidamente empacadas para evitar la deshidratación y el contacto con fuentes de contaminación.

Evitar la proliferación de microorganismo en los brotes destinados al cultivo *in vitro* minimizando la manipulación y contacto directo con los brotes de morera durante su desarrollo en condiciones ambientales controladas, adicionalmente los brotes deben estar en un ambiente aislado de fuentes de contaminación potenciales como: insectos corrientes de aire y agua.

Realizar modificaciones al método de inducción de brotes de *M. alba* cultivar Taig song, con el fin de evitar la oxidación de las yemas y lograr el desarrollo eficiente de brotes aptos para ser empleados como fuente de explantes para el cultivo *in vitro*.

Adelantar investigaciones en propagación y cultivo *in vitro* en otros cultivares de morera, empleando el método de inducción de brotes propuesto por Cholo y Delgado (2011) como fuente alternativa de material vegetal.

Evaluar la efectividad el peróxido de hidrógeno y concentraciones de hipoclorito de sodio diferentes a las empleadas en los segmentos nodales no lignificados.

Evaluar la multiplicación, elongación y enraizamiento de brotes de *M. alba* cultivar Kanva 2 y *M. australis* cultivar Taig song empleando como explantes segmentos nodales no lignificados desarrollados en condiciones ambientales controladas, variando las concentraciones y tipo de citoquininas y auxinas agregadas al medio de cultivo.

## 8. LITERATURA CITADA

- Acharya, J. (1994). *Women in development: the sericulture experience in India*. Indian publishers distributors. Retrieved from <http://books.google.com.co/books?id=UapAAAAMAAJ>
- Acosta, R. (2000). Estandarizacion de la tecnica de micropropagacion para la obtencion masiva de plantas de ñame espino (*Dioscorea. rotundata*) mediante el cultivo *In vitro* de segmentos nodales. Universidad de Sucre.
- Aznar, C., y Salvador, D. (2013). *El gusano de seda, Bombyx mori (Linneo, 1758) (Lepidoptera: Bombycidae) como plataforma de producción de proteínas naturales y recombinantes. Aplicaciones en biotecnología e ingeniería de tejidos*. Universidad de Murcia.
- Balakrishnan, V., Latha, M., Ravindran, K., y Robinson, J. (2009). Clonal propagation of *Morus alba* L. through nodal and axillary bud explants. *Botany research international*, 2(1), 42–49.
- Bapat, V., Mhatre, M., y Rao, P. (1987). Propagation of *Morus indica* L.(mulberry) by encapsulated shoot buds. *Plant cell reports*, 6(5), 393–395.
- Becerra, N., y Chaparro, M. (1999). Morfología y anatomía vegetal. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Benedetta, C., Germana, P., y Germana, M. (2007). *In vitro* response of two sicilian genotypes of *Morus* (L.) through axillary bud culture, 60(1), 178–181
- Bhau, B., y Wakhlu, A. (2001). Effect of genotype, explant type and growth regulators on organogenesis in *Morus alba*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 66(1), 25–29.
- Bolaños, A. (2001). *Introducción a la Olericultura*. San José: Universidad Estatal a Distancia. Retrieved from [https://books.google.com.co/books?id=vBS\\_GwlrE1MC](https://books.google.com.co/books?id=vBS_GwlrE1MC)
- Cassells, A. (1991). Problems in tissue culture: culture contamination. In *Micropropagation* (pp. 31–44). Springer.
- Central Silk Board. (1997). *Indian silk*. Central silk board. Retrieved from <http://books.google.com.co/books?id=RSVIAAAAYAAJ>

- Central Silk Board. (1999). *Indian Silk*. Central silk board. Retrieved from <http://books.google.com.co/books?id=FiJIAAAAYAAJ>
- Chakraborti, S., Vijayan, K., Roy, B., y Qadri, S. (1998). *In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). *Plant cell reports*, 17(10), 799–803.
- Chattopadhyay, S., Chattopadhyay, S., y Datta, S. (1990). Quick *In vitro* production of mulberry (*Morus alba*) plantlets for commercial purpose. *Indian journal of experimental biology*, 28(6), 522–525.
- Chattopadhyay, S., Doss, S., Halder, S., Ali, A., y Bajpai, A. (2011). Comparative micropropagation efficiency of diploid and triploid mulberry (*Morus alba* cv. S1) from axillary bud explants. *African journal of biotechnology*, 10(79), 18153–18159. <http://doi.org/10.5897/AJB10.1474>
- Chitra, V., Chinthapalli, B., y Padmaja, G. (2014). Efficient regeneration system for genetic transformation of mulberry (*Morus indica* L. Cultivar S-36 ) using *in vitro* derived shoot meristems, 2014(January), 1–6.
- Chitra, V., y Padmaja, G. (1999). Clonal propagation of mulberry (*Morus indica* L. cultivar M-5) through *In vitro* culture of nodal explants. *Scientia horticulturae*, 80(3-4), 289–298. [http://doi.org/10.1016/S0304-4238\(98\)00252-0](http://doi.org/10.1016/S0304-4238(98)00252-0)
- Chitra, V., y Padmaja, G. (2002). Seasonal influence on axillary bud sprouting and micropropagation of elite cultivars of mulberry. *Scientia horticulturae*, 92(1), 55–68. [http://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00279-5](http://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00279-5)
- Cholo, L., y Delgado, H. (2011). *Formación de callos en el cultivo de morera (Morus alba L.)*. Universidad tecnica de Cotopaxi.
- Cifuentes, C. (1995, November). ¿Quién sembró la primera planta de Morera en Colombia? *Sericultura Colombiana*, 10–13.
- Cifuentes, C., y Sohn, K-W. (1998). Manual técnico de sericultura: Cultivo de la morera y cría del gusano de seda en el trópico. *Convenio SENA-CDTS. Colombia*.
- Corseda. (2007). *Plan estratégico de Mercadeo 2008-2010-CORSEDA*. Popayán.
- Corseda. (2014). QUIENES SOMOS. Retrieved from <http://www.corseda.com/quienessomos.html>

- Cortes, C., y Perea, M. (2001). Propagación *In vitro* de morera (*Morus indica*. L.). *Biotechnología agrícola: un enfoque hacia el mejoramiento de plantas*, 203–210.
- Debergh, P., y Maene, L. (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia horticultrae*, 14(4), 335–345.
- Dennis, D., Upper, C., y West, C. (1965). An enzymic site of inhibition of gibberellin biosynthesis by Amo 1618 and other plant growth retardants. *Plant physiology*, 40(5), 948.
- Elobeidy, A., y Korban, S. (1988). The effect of thiadiazuron on shoot regeneration from apple leaf-disks. In *HortScience* (Vol. 23, p. 755). amer soc horticultural science 701 north saint asaph street, alexandria, va 22314-1998.
- Enmoto, S. (1987). Preservation of genetic resource of mulberry by means of tissue culture. *Japan agricultural research quarterly (JARQ)*.—*Japan international research center for agricultural sciences*, 21(3), 205–210.
- García, J., Krause, B., y Perea, O. (2000). Estudio de adaptación de materiales promisorios de morera en la zona central cafetera de Colombia, 51(1), 54–65.
- George, E., Hall, M., y Klerk, G.-J. (2008a). Micropropagation: uses and methods. In E. George, M. Hall, & G.-J. Klerk (Eds.), *Plant propagation by tissue culture SE - 2* (pp. 29–64). Springer Netherlands. [http://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_2](http://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_2)
- George, E., Hall, M., y Klerk, G.-J. (2008b). Plant growth regulators I: introduction; auxins, their analogues and inhibitors. In E. George, M. Hall, & G.-J. Klerk (Eds.), *Plant propagation by tissue culture SE - 5* (pp. 175–204). Springer Netherlands. [http://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_5](http://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_5)
- George, E., Hall, M., y Klerk, G.-J. (2008c). Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In E. George, M. Hall, & G.-J. Klerk (Eds.), *Plant propagation by tissue culture SE - 6* (pp. 205–226). Springer Netherlands. [http://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_6](http://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_6)
- George, E., Hall, M., y Klerk, G.-J. (2008d). The components of plant tissue culture media I: macro- and micro-nutrients. In E. George, M. Hall, & G.-J. Klerk (Eds.), *Plant propagation by tissue culture SE - 3* (pp. 65–113). Springer Netherlands. [http://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_3](http://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_3)



- George, E., Hall, M., y Klerk, G.-J. (2008e). The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and ph effects, and support systems. In E. George, M. Hall, & G.-J. Klerk (Eds.), *Plant propagation by tissue culture SE - 4* (pp. 115–173). Springer Netherlands. [http://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_4](http://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_4)
- González, R., y Gómez, J. (1997, July). Comportamiento en el enraizador de ocho (8) variedades de morera (*Morus* spp.) en la granja “El Pilamo.” *Sericultura Colombiana*.
- Gutiérrez, C. (2012). Células madre vegetales. *Investigación y ciencia*.
- Hall, R. (1999). *Plant cell culture protocols*. New Jersey: Humana Press. Retrieved from [https://books.google.com.co/books?id=8D6dDY\\_u9TQC](https://books.google.com.co/books?id=8D6dDY_u9TQC)
- Huetteman, C., y Preece, J. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant cell, tissue and organ culture*, 33(2), 105–119.
- Iáñez, E. (2003). Acción de los agentes químicos sobre las bacterias. *Curso de microbiología general [citado 15 Ago 2007]*. Retrieved from [http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/19\\_micro.html](http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/19_micro.html)
- Islam, R., Joarder, O., Hossain, M., Zaman, A., y Barman, A. (1994). Clonal propagation of *Morus alba* L. cv. S 1 from nodal explants of mature trees: maintenance of proliferating cultures. *Sericologia (France)*.
- Iwai, T., Kaku, H., Honkura, R., Nakamura, S., Ochiai, H., Sasaki, T., y Ohashi, Y. (2002). Enhanced resistance to seed-transmitted bacterial diseases in transgenic rice plants overproducing an oat cell-wall-bound thionin. *Molecular Plant-microbe interactions*, 15(6), 515–521.
- Kavyashree, R. (2007). A repeatable protocol for *in vitro* micropropagation of mulberry variety S 54, 6(July), 385–388.
- Kitahara, N., Jian, L., Yuyin, C., Sánchez, M., y Xingmeng, L. (2001). Mulberry-pasture association system in Japan. *Mulberry for animal feeding in china. China*, 27–28.
- Labas, M., Zalazar, C., Brandi, R., y Cassano, A. (2008). Reaction kinetics of bacteria disinfection employing hydrogen peroxide. *Biochemical Engineering Journal*, 38(1), 78–87. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2007.06.008>

- Lalitha, N., Kih, S., Banerjee, R., Chattopadhyaya, S., Saha, A., y Bindroo, B. (2013). High frequency multiple shoot induction and *in vitro* regeneration of mulberry (*Morus indica* L. cv. S-1635). *Int. J. Adv. Res.*, 1, 22–26.
- Lemos, C. (2012). TEXTILES: Fibras naturales una moda ideal para el planeta. *Catorce6*. Retrieved from <http://catorce6.com/index.php/noticias/item/54-textiles-fibras-naturales-una-moda-ideal-para-el-planeta>
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., y Mroginski, L. (2004). *Biotecnología y mejoramiento vegetal II* (INTA). ArgenBio.
- Li, J. (2007). Flora of China. *Harvard papers in botany*, 13(2), 301–302.
- Linsmaier, E., y Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 18(1), 100–127.
- Lu, M-C. (2002). Micropropagation of *Morus latifolia* Poilet using axillary buds from mature trees. *Scientia horticulturae*, 96(1), 329–341.
- Martínez, P. (1987). Obtención de plantas libres de patógenos mediante el cultivo de tejidos meristemáticos y termoterapia. *Revista ICA (Colombia)*, 22, 230–248.
- Mendonça, V., Carvalho, F., Nogueira, P., Abreu, P., y Hellen, M. (2010). Substratos no enraizamento de estacas de amoreira (*Morus alba* L.) substartes on rooting of berry cuttings (*Morus alba* L.), 7–11.
- Mhatre, M., Bapat, V., y Rao, P. (1985). Regeneration of plants from the culture of leaves and axillary buds in mulberry (*Morus indica* L.). *Plant cell reports*, 4(2), 78–80.
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annual review of plant physiology*, 25(1), 135–166.
- Murashige, T., y Huang, L-C. (1985). Cloning plants by tissue culture: Early years, current status and future prospects. In *symposium on in vitro problems related to mass propagation of horticultural plants* 212 (pp. 35–42).
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473–497.

- Nepal, M. (2008). *Systematics and reproductive biology of the genus Morus L.(Moraceae)*. ProQuest.
- Oka, S., y Ohyama, K. (1974). Studies on *In vitro* culture of excised buds in mulberry tree, 1: Effects of growth substances on the development of shoots and organ formation from winter buds. *Journal of sericultural science of Japan*, 43.
- Oka, S., y Ohyama, K. (1975). Studies on *In vitro* culture of excised buds in mulberry tree, 2: Effects of growth substances on the development of shoots from axillary bud. *Journal of sericultural science of Japan*, 44.
- Oka, S., y Ohyama, K. (1978). Studies on *In vitro* culture of excised buds in mulberry tree, 3: Effects of agar concentration, pH and sugars of medium on the development of shoots from winter buds. *Journal of sericultural science of Japan*, 47.
- Oka, S., y Ohyama, K. (1982). Sugar utilization in mulberry (*Morus alba* L.) bud culture. In *Plant tissue culture 1982: proceedings, 5th International congress of plant tissue and cell culture held at Tokyo and Lake Yamanake, Japan, July 11-16, 1982/edited by Akio Fujiwara*. Tokyo: Japanese association for plant tissue culture,[1982?].
- Patel, G., Bapat, V., y Rao, P. (1983). *In vitro* culture of organ explants of *Morus indica*: Plant regeneration and fruit formation in axillary bud culture. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 111(5), 465–468.
- Pattnaik, S., y Chand, P. (2000). Morphogenic response of the alginate-encapsulated axillary buds from *In vitro* shoot cultures of six mulberries. *Plant cell, tissue and organ culture*, 60(3), 177–185.
- Pattnaik, S., y Chand, P. (1997). Rapid clonal propagation of three mulberries, *Morus cathayana* HemsL, *M. lhou* Koiz. and *M. serrata* Roxb., through *In vitro* culture of apical shoot buds and nodal explants from mature trees. *Plant cell reports*, 16(7), 503–508.
- Pattnaik, S., Sahoo, Y., y Chand, P.(1996). Micropropagation of a fruit tree, *Morus australis* Poir. syn. *M. acidosa* Griff. *Plant cell reports*, 15(11), 841–845.
- Rao, C., y Jarvis, C. (1986). Lectotypification, taxonomy and nomenclature of *Morus alba*, *M. tatarica* and *M. indica* (Moraceae). *Taxon*, 705–708.

- RAPA, & FAO. (1989). *Sericulture development in Asia*. Regional Office for Asia and the Pacific (RAPA), Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved from <http://books.google.com.co/books?id=SiAoAQAAMAAJ>
- Ruiz, F., Badía, L., y González, A. (2009). *Técnicas en histología y biología celular*. Elsevier Masson. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=EwbAJcs0ZGoC>
- Sajeevan, R., Singh, S., Nataraja, K., y Shivanna, M. (2011). An efficient *in vitro* protocol for multiple shoot induction in mulberry , *Morus alba* L variety V1, 2(8), 254–261.
- Salas, J., Agramonte, D., Jiménez, T., Collado, L. , y Pérez, P. (2006). Caracteres morfológicos de plantas de *Morus alba* L. derivadas del cultivo *In vitro* en condiciones de campo. *Ra Ximhai*, 2(2), 469–479.
- Salas, E., Agramonte, D., Barbón, R., Jiménez, T., Collado, L., Pérez, P., y Gutiérrez, O. (2005). Propagación *In vitro* de *Morus alba* L . en medio de cultivo semisólido, 5(2), 81–87.
- Salas, E., Agramonte, D., Barbón, R., Jiménez, T., Collado, L., Pérez, P., y Ramírez, A. (2004). Establecimiento *In vitro* de morera. *Bioteología vegetal*, 4(2), 15–19.
- Salazar, E., y Surga, J. (1998). Métodos de desinfección de explantes de caña de azúcar en el cultivo *in vitro*. *Caña de azúcar*, 6, 105–112. Retrieved from [http://sian.inia.gov.ve/repositorio/revistas\\_ci/canadeazucar/cana0602/texto/me todos.htm](http://sian.inia.gov.ve/repositorio/revistas_ci/canadeazucar/cana0602/texto/me todos.htm)
- Salazar, R., y Hoyos, R. (2007). Multiplicación y tuberización *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal. *Revista facultad nacional de agronomía medellín*, 60(2), 3907–3921.
- Sánchez, M. (2002). *Mulberry for animal production: proceedings of an electronic conference carried out between may and august 2000*. Food and Agriculture Org.
- Sánchez, A., y González, L. (2007). Técnicas de recolecta de plantas y herborización. págs. 123–133. *Internet: Http://es. Scribd.com/doc/7996149/12-Tecnicas-de-Recolectade-Plantas-Y-Herborizacion* Accesado.

- Sociedad Catalana de Farmacia Clínica. (2005). *Limpieza, desinfección y esterilización en el ámbito hospitalario*. Barcelona. Retrieved from <http://www.scfarmclin.org/docs/higiene/higiene.pdf>
- Tewari, A., Bhatnagar, S., y Khurana, P. (1999). *In vitro* response of commercially valuable cultivars of morus species to thidiazuron and activated charcoal. *Plant biotechnology*, 16(5), 413–417.
- Tewary, P., y Oka, S. (1999). Simplified clonal multiplication of mulberry using liquid shake culture. *Plant cell, tissue and organ culture*, 59(3), 223–226.
- Tewary, P., Sarkar, A., Kumar, V., y Chakraborty, S. (1995). Rapid *In vitro* multiplication of high yielding mulberry (*Morus* spp.) genotypes V1 and S34. *Indian J. Sericult.*, 34, 133–136.
- Thomas, T. (2003). Thidiazuron induced multiple shoot induction and plant regeneration from cotyledonary explants of mulberry. *Biologia plantarum*, 46(4), 529–533. <http://doi.org/10.1023/A:1024807426591>
- Tingzing, Z., Yunfang, T., Guangxian, H., Huaizhong, F., y Ben, M. (1988). *Mulberry cultivation*. FAO.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical. (1982). *El cultivo de meristemas para el saneamiento de clones de yuca: guía de estudio*. CIAT. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=yN9xhNIBfVwC>
- Universidad de Pamplona. (2008). *Manual de desinfección*. Pamplona: Universidad de Pamplona. Retrieved from [http://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/hermesoft/portallG/home\\_9/recursos/01\\_general/contenidos/laboratorios/guiasyfichas/25022008/manualdelimpiezaydesinfeccion.pdf](http://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/hermesoft/portallG/home_9/recursos/01_general/contenidos/laboratorios/guiasyfichas/25022008/manualdelimpiezaydesinfeccion.pdf)
- Universidad Politécnica de Valencia. (2003). Latencia de yemas y semillas. Retrieved from [http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema\\_16.htm#Latencia de yemas](http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema_16.htm#Latencia de yemas)
- Vignoli, R. (2002). Esterilización y desinfección. In *libro del instituto de higiene de la Udelar*. Montevideo: Instituto de Higiene de la Universidad de la Republica Uruguay.

- Vijayan, K., Saratchandra, B., y Teixeira da Silva, J. (2011). Germplasm conservation in mulberry (*Morus* spp.). *Scientia horticultrae*, 128(4), 371–379. <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.11.012>
- Vijayan, K., Tikader, A., y Teixeira, J. (2011). Application of tissue culture techniques for propagation and crop improvement in mulberry (*Morus* spp.).
- Zaman, A., Islam, R., Hossain, M., Hossain, A., Barman, A., y Joarder, N. (1992). Effects of different sugars on *In vitro* shoot proliferation of *Morus alba* CV S1. *Bulletin of sericulture research*, 3, 14–17. Retrieved from [http://180.211.164.225/rmis/index.php?t=detail\\_info&linkid=4557](http://180.211.164.225/rmis/index.php?t=detail_info&linkid=4557)

## ANEXOS

Anexo 1. Características de los brotes según la posición de la estaca en las ramas de *M. alba* cultivar Kanva 2, desarrollados en condiciones ambientales controladas. Los datos se proporcionan en términos de la media  $\pm$  el error estándar.

Características de los brotes	Posición de la estaca en la rama		
	Basal	Central	Apical
Número de brotes por estaca	1,15a $\pm$ 0,23	1,90b $\pm$ 0,14	2,15b $\pm$ 0,17
Longitud del brote (mm)	39,42a $\pm$ 2,91	31,28b $\pm$ 1,34	25,20c $\pm$ 1,48
Diámetro del tallo del brote (mm)	2,27a $\pm$ 0,097	2,03b $\pm$ 0,050	1,95b $\pm$ 0,061
Tiempo transcurrido para la brotación	9,50a $\pm$ 2,10	9,44a $\pm$ 0,79	6,80b $\pm$ 0,38

Veinte estacas fueron empleadas por tratamiento. Los promedios seguidos por la misma letra en una fila no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acuerdo al ANOVA de una vía, seguido del Test de rangos múltiples de Student-Newman-Keuls.

Anexo 2. Características morfológicas de *M. alba* cultivar Kanva 2.

Característica	Descripción
Inflorescencia	Tipo amento. Longitud $1 \pm 0,2$ cm cuando madura sin incluir pedúnculo, amentos con flores femeninas y flores perfectas. Pedúnculo pubescente. 1 amento por nudo.
Flores	Pétalos ausentes, 4 sépalos. Ovario único con estigma bicarpelar, Estilo corto (0,5 – 0,8 mm). Estigma papiloso. Flores perfectas con tres anteras, en ocasiones no emergen y quedan ocultas bajo los sépalos. Color verde poco llamativo
Infrutescencia	Tipo sorosis, longitud de 1,3 cm; color blanco verdoso cuando inmaduros y negro violáceo cuando madura. Longitud del pedúnculo 0,4 - 0,5 cm, presencia de estilos vestigiales y anteras.
Estipulas	Dos estipulas lanceoladas, deciduas, color verde manzana de aproximadamente 1 cm de longitud.
Hojas	Hojas enteras, sin lóbulos, ligeramente cordadas a ovales, ápice caudado o acuminado, base acunada o ligeramente cordada, margen acutado-serrado. Superficie adaxial glabra. Superficie abaxial con abundante pubescencia lanceolada en las axilas de las venas secundarias y escasa a lo largo de la vena. Venas secundarias se extienden $\frac{1}{2}$ de la longitud del limbo. Textura membranosa, Color verde claro brillante. Longitud del peciolo 3 cm $\pm 0.5$ .
Yemas	Forma triángulo regular, glabra, escamas café grisáceo en yemas durmientes, longitud de $3,5 \pm 0,5$ mm, no adheridas al tallo con dos yemas accesorias en ocasiones cubiertas por escamas.



Anexo 3. Características morfológicas de *M. australis* cultivar Taig song.

Característica	Descripción
Inflorescencia	Solo Inflorescencias con flores masculinas tipo amento. Longitud $1,75 \pm 0,25$ cm sin incluir pedúnculo cuando maduras, Pedúnculo pubescente de $1 \pm 0,15$ cm. 2 inflorescencias por nudo, originadas de las yemas accesorias. De 25 a 30 flores por amento.
Flores	Masculinas con pétalos ausentes, 4 sépalos medianamente pubescentes, color café rojizo cuando madura. 4 estambres con anteras aladas ligeramente amarillas. Pequeña protuberancia remplazando el pistilo.
Estipulas	Dos estipulas lanceoladas, deciduas, color verde manzana de aproximadamente 1,4 cm de longitud.
Hojas	Hojas enteras cordadas, en ocasiones tri o bilobuladas de forma asimétrica o irregular en la misma planta, ápice muy acuminado, base cordada en ocasiones amorfa, margen fuertemente aserrado. Superficie adaxial glabra. Superficie abaxial con escasa pubescencia lanceolada a lo largo de la venas. Textura coriácea. Color verde oscuro. Brotes de hojas jóvenes presentan pigmentos de color café rojizo.
Yemas	Forma triangulo regular, glabra, escamas café oscuro en yemas durmientes, longitud de $6 \pm 0,8$ mm, no adheridas al tallo, ocasionalmente con inclinación lateral, dos yemas accesorias en ocasiones cubiertas por escamas de la yema principal.