



"Enseñar la explotación de la  
tierra, no la del hombre"

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**

**INSTITUTO DE HORTICULTURA**

**OBTENCIÓN *in vitro* DE CALLOS DE MORERA *Morus spp.* COMO  
ALTERNATIVA ALIMENTICIA PARA GUSANOS DE SEDA *Bombyx mori***

**TESIS**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO  
ACADÉMICO DE MAESTRA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA**



DIRECCION GENERAL ACADEMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

**PRESENTA:**

**ING. ALMA ROSA HERNÁNDEZ ROJAS**



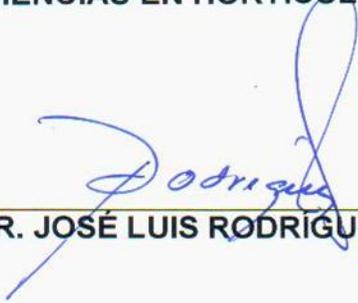
**Chapingo, México, Junio 2014**

**Instituto de Horticultura**

La presente tesis titulada “**OBTENCIÓN *in vitro* DE CALLOS DE MORERA *Morus spp.* COMO ALTERNATIVA ALIMENTICIA PARA GUSANOS DE SEDA *Bombyx mori*”** ha sido realizada por la C. Alma Rosa Hernández Rojas bajo la dirección del Dr. José Luis Rodríguez de la O y asesorada por los CC. Dr. Jaime Sahagún Castellanos y Dr. Alejandro Rodríguez Ortega. Ha sido revisada y aprobada por el H. Jurado Examinador, como requisito parcial para obtener el título de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA**

**DIRECTOR**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O**

**ASESOR**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. JAIME SAHAGÚN CASTELLANOS**

**ASESOR**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. ALEJANDRO RODRÍGUEZ ORTEGA**

Chapingo, México, Junio 2014

## **DATOS BIOGRÁFICOS**

La C. Alma Rosa Hernández Rojas nació el 20 de Junio de 1985, en la Ciudad de México, radicó en la comunidad de Cuatlimax Tlanchinol Hidalgo, hasta terminar sus estudios básicos. En el año 2000 se incorporó a la Preparatoria No. 1 de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; del 2003 al 2005 prestó un servicio social como instructor comunitario y capacitador tutor en el Consejo Nacional de Fomento Educativo, Delegación Hidalgo; en el año 2005 ingresó a la Universidad Politécnica de Francisco I. Madero donde se recibió como Ingeniera en Agrotecnología. Del 2009 al 2010 se desempeñó como Técnico de campo agrícola en un Despacho particular en el estado de Chiapas, en el 2011 participó en un proyecto de investigación en la Universidad de la que egresó. En el año 2012 ingresó al posgrado realizando la Maestría en Ciencias en Horticultura de la Universidad Autónoma Chapingo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma Chapingo, por la oportunidad de continuar mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo recibido durante mis estudios en el posgrado de Maestría.

Al Dr. José Luis Rodríguez de la O por aceptar la dirección de este proyecto, su invaluable apoyo, disposición y paciencia durante el desarrollo de la investigación

Al Dr. Jaime Sahagún Castellanos por haber aceptado formar parte de mi comité y sus valiosas aportaciones en la investigación.

Al Dr. Alejandro Rodríguez Ortega por su inmenso apoyo y disposición para realizar la presente investigación.

Al Dr. Juan Martínez Solís, por sus acertadas observaciones y aportaciones en la elaboración de la presente tesis.

A todos los catedráticos y amigos que se involucraron brindándome su apoyo en el desarrollo de mis estudios de Maestría.

Un agradecimiento especial a la Dra. Ma. Antonia Pérez Olvera por el impulso y apoyo brindado para realizar mis estudios de Maestría.

## **DEDICATORIA**

*A Rosa María Rojas y José Hernández, mis padres, seres incansables, soñadores y guerreros, que con su ejemplo, apoyo incondicional y palabras de fortaleza cuando me sentía desfallecer, me han enseñado que todo es posible cuando así se decide.*

*A mis hermanos Angeles, David y Susy, por su invaluable apoyo, comprensión y cariño.*

*A la Sra. Gloria Virginia Domínguez Romero por permitirme entrar a su hogar, por su valioso apoyo y amistad brindada.*

*A Juan Javier García Flores por lo compartido, aquí y ahora, por sus enseñanzas y amistad brindadas que me han ayudado a ser libre.*

*A Eric Bautista Gómez por lo que prevalece rompiendo las imponentes barreras del tiempo y la distancia.*

*A Paty, Alex, José Joaquín, Juan y todas las personas (grandes amigos y compañeros) que han influido de alguna manera en mi formación académica.*

*Especialmente a mi gran amigo Heriberto por el apoyo incondicional, por estar, aún en la distancia.*

*In memóriam* de Daniela M. Moroyoqui Ovilla

y

Mayola Rojas García

...–Lo que ustedes necesitan –prosiguió el Salvaje– es algo con lágrimas, para variar. Aquí nada cuesta lo bastante. –Atreverse a exponer lo que es mortal e inseguro al azar, la muerte y el peligro, aunque sólo sea por una cáscara de huevo... ¿No hay algo en esto? –preguntó el Salvaje, mirando a Mustafá Mond–. Dejando aparte a Dios, aunque, desde luego, Dios sería una razón para obrar así. ¿No tiene su hechizo el vivir peligrosamente?... –Es que a mí me gustan los inconvenientes. –A nosotros, no– dijo el interventor–. Preferimos hacer las cosas con comodidad. –Pues yo no quiero comodidad. Yo quiero a Dios, quiero poesía, quiero peligro real, quiero libertad, quiero bondad, quiero pecado. –En suma –dijo Mustafá Mond–, usted reclama el derecho a ser desgraciado. –Muy bien, de acuerdo –dijo el Salvaje, en tono de reto–. Reclamo el derecho a ser desgraciado. –Esto, sin hablar del derecho a envejecer, a volverse feo e impotente, el derecho a tener sífilis y cáncer, el derecho a pasar hambre, el derecho a ser piojoso, el derecho a vivir en el temor constante de lo que pueda ocurrir mañana; el derecho a pillar un tifus; el derecho a ser atormentado–. Siguió un largo silencio. –Reclamo todos estos derechos–. Concluyó el Salvaje.

Mustafá Mond se encogió de hombros. – Están a su disposición– dijo.

***Un mundo feliz***

Aldous Huxley

## ÍNDICE GENERAL

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
DATOS BIOGRÁFICOS	
AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIA	IV
ÍNDICE GENERAL	VII
ÍNDICE DE CUADROS	XII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
RESUMEN	XVI
ABSTRAC	XVII
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>2</b>
2.1 Objetivo general	2
2.2 Objetivos particulares	2
<b>3. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
3.1. Clasificación sistemática y descripción botánica de la morera ( <i>Morus spp.</i> )	3
3.1.1. Hojas	3
3.1.2. Ramas	4

3.1.3. Inflorescencia	5
3.1.4. Fruto	6
3.1.5. Requerimientos ambientales	7
3.1.5.1. Altitud	7
3.1.5.2. Suelo	7
3.1.5.3. Temperatura	8
3.1.5.4. Precipitación	8
3.1.5.5. Humedad relativa	8
3.1.5.6. Luminosidad	8
3.1.6. Propagación	9
3.1.7. Fertilización	9
3.1.8. Manejo de plagas y enfermedades	10
3.1.9. Usos	10
3.2. Gusanos de seda ( <i>Bombyx mori</i> )	11
3.2.1. Clasificación taxonómica	11
3.2.2. Razas	11
3.2.3. Ciclo de vida	12
3.2.4. Condiciones ambientales para el manejo de gusanos de seda.	13
3.2.5. Sanidad	14
3.2.6. Formación y colecta de capullos de seda	15
3.3. Obtención de la seda	15
3.4. Actividad sericícola	17

3.5. Costos de producción de hilo de seda en México	19
3.6. Características generales del cultivo de tejidos vegetales	20
3.6.1. Técnicas de propagación <i>in vitro</i>	21
3.6.1.1. Propagación clonal	21
3.6.1.2. Suspensiones celulares	21
3.6.1.3. Protoplastos	22
3.6.1.4. Anteras	22
3.6.1.5. Embriones y óvulos	22
3.6.2. Micropropagación	23
Fase 0	23
Fase I	23
Fase II	23
Fase III	24
Fase IV	24
3.6.2.1. Ventajas de la micropropagación	24
3.6.2.2. Desventajas de la micropropagación	25
3.7. Medios de cultivo	25
3.7.1. Vitaminas	26
3.7.2. Myo-inositol	27
3.7.3. Fuentes de carbono	27
3.7.4. Reguladores de crecimiento	28

3.7.5. Aminoácidos y amidas	29
3.7.6. Agente gelificante	30
3.7.7. Formulaciones básicas en medios de cultivo <i>in vitro</i>	31
3.8. Contaminación <i>in vitro</i>	32
3.9. Ventajas y desventajas del cultivo <i>in vitro</i> en tejidos vegetales	33
3.10. Importancia de la callogénesis	35
3.11. Cultivo <i>in vitro</i> de morera	37
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>39</b>
4.1. Fase 1: Obtención <i>in vitro</i> de callos de morera	39
4.1.1. Ubicación del experimento	39
4.1.2. Material vegetal	39
4.1.3. Acondicionamiento del material vegetal	39
4.1.4. Bioensayo para la obtención de callos de morera	40
4.1.5. Experimento	42
4.1.5.1. Desinfestación de explantes	42
4.1.5.2. Medio de cultivo	42
4.1.5.3. Siembra <i>in vitro</i> de los explantes en el experimento	43

4.1.5.4. Diseño experimental	44
4.1.5.5. Variables y toma de datos	45
4.2 Fase 2. Alimentación de larvas <i>Bombyx mori</i> con callos de morera	45
4.2.1. Diseño experimental	46
4.2.2. Evaluación de Variables	47
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>48</b>
5.1. Fase 1. Obtención <i>in vitro</i> de callos en morera	48
5.1.1. Respuesta en la variable masa	50
5.1.2. Respuesta en volumen (cm <sup>3</sup> ) de los callos obtenidos <i>in vitro</i>	53
5.1.3. Respuesta en las variables textura y color de los callos obtenidos <i>in vitro</i>	58
5.2. Fase 2. Alimentación de larvas <i>Bombyx mori</i> con callos de morera	61
5.2.1. Respuesta en la variable longitud	61
5.2.2. Respuesta en la variable peso	62
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>66</b>
<b>7. RECOMENDACIONES</b>	<b>67</b>
<b>8. LITERATURA CITADA</b>	<b>68</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
<b>Cuadro 1.</b> Estimación de ingresos económicos anuales, obtenidos a partir de la venta de hilo de seda.	19
<b>Cuadro 2.</b> Composición de cuatro medios másicos para el cultivo <i>in vitro</i> de tejidos.	31
<b>Cuadro 3.</b> Tratamientos experimentales en var. SLP5 y SLP3 de morera.	43
<b>Cuadro 4.</b> Medias de la variable masa de callos <i>in vitro</i> de <i>Morus spp.</i> en tratamientos.	52
<b>Cuadro 5.</b> Medias de la variable masa de callos <i>in vitro</i> de <i>Morus spp.</i> en cada zona de hoja.	52
<b>Cuadro 6.</b> Medias de la variable masa de dos variedad de callos <i>in vitro</i> de <i>Morus spp.</i>	53
<b>Cuadro 7.</b> Medias de la variable volumen de callos <i>in vitro</i> de <i>Morus spp.</i> en tratamientos.	55
<b>Cuadro 8.</b> Medias de la variable volumen por zona de hoja	55
<b>Cuadro 9.</b> Medias de la variable masa de callos <i>in vitro</i> en dos variedades de <i>Morus spp.</i>	56
<b>Cuadro 10.</b> Color de los callos obtenidos <i>in vitro</i> de morera en los diferentes tratamientos.	59

<b>Cuadro 11.</b> Medias de la variable longitud de larvas <i>Bombyx mori</i> en 35 días.	62
<b>Cuadro 12.</b> Media de la variable peso de larvas <i>Bombyx mori</i> en 35 días.	63
<b>Cuadro 13.</b> Promedios de longitud y peso en larvas <i>Bombyx mori</i> con una dieta combinada con callos <i>in vitro</i> y follaje fresco de <i>morera</i> en la semana 5.	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Forma de la hoja de <i>Morus spp.</i>	4
<b>Figura 2.</b> Ramas de <i>Morus spp</i>	5
<b>Figura 3.</b> Inflorescencia de <i>Morus spp</i>	6
<b>Figura 4.</b> Frutos de <i>Morus spp.</i>	7
<b>Figura 5.</b> Razas de gusanos de seda.	12
<b>Figura 6.</b> Actividad económica de la sericicultura en México.	18
<b>Figura 7.</b> a y b) Prueba de aceptación de los callos obtenidos <i>in vitro</i> de morera en larvas <i>Bombyx mori</i> .	47
<b>Figura 8.</b> Contaminación <i>in vitro</i> por: a) bacterias y b) hongos	48
<b>Figura 9.</b> Recuperación <i>in vitro</i> de explantes contaminados.	49
<b>Figura 10.</b> a, b y c) formación paulatina de callos desde la periferia de explantes en la segunda, cuarta y sexta semana después de la siembra respectivamente; d y e) crecimiento máximo de los callos en la octava semana; f) vista microscópica de los callos en la octava semana de su desarrollo.	50
<b>Figura 11.</b> Peso promedio de callos obtenidos <i>in vitro</i> de <i>Morus spp.</i> de las variedades SLP5 y SLP3, en la semana 8. T1 (1.0 mg·l <sup>-1</sup> 2, 4-D – 3.0 mg·l <sup>-1</sup> TDZ), T2 (3.0 mg·L <sup>-1</sup> 2,4- D y 1.0 mg·l <sup>-1</sup> TDZ), T3 (1.0 mg·l <sup>-1</sup> 2, 4-D – 1.0 mg·l <sup>-1</sup> TDZ) y el T4 (3.0 mg·l <sup>-1</sup> 2,4-D y 3.0 0 mg·l <sup>-1</sup> TDZ).	51

- Figura 12.** Volumen promedio de callos obtenidos *in vitro* de *Morus spp.* de las variedades SLP5 y SLP3, en la semana 8. T1 (1.0 mg·l<sup>-1</sup> 2, 4-D – 3.0 mg·l<sup>-1</sup> TDZ), T2 (3.0 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D y 1.0 mg·l<sup>-1</sup> TDZ), T3 (1.0 mg·l<sup>-1</sup> 2, 4-D – 1.0 mg·l<sup>-1</sup> TDZ) y el T4 (3.0 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D y 3.0 0 mg·l<sup>-1</sup> TDZ). 54
- Figura 13.** Coloración de callos *in vitro* en: a) cuarta semana de desarrollo, b) séptima semana de desarrollo. c) callo necrosado después de la octava semana. 59
- Figura 14.** Dieta de larvas *Bombix mori* con callos de morera obtenidos de manera *in vitro* en: a y b) la primera etapa larvaria; c y d) la cuarta etapa larvaria. 61
- Figura 15.** a) Elaboración de capullos de seda; b) Emergencia de mariposas *Bombyx mori*; c) Reproducción de gusanos de seda. 64
- Figura 16.** Capullos obtenidos de los adultos *Bombyx mori* alimentadas con los callos *in vitro* de *Morus spp.* de la variedad: a) SLP5 y b) SLP3. 65

## RESUMEN

Las condiciones *in vitro* para promover la desdiferenciación celular en tejido de hoja y originar callogénesis fueron evaluadas en plantas de *Morus alba*, var. SLP5 y SLP3. Los callos obtenidos se adicionaron en la dieta alimenticia de gusanos de seda, en el Laboratorio de Cultivo de tejidos vegetales de la Universidad Autónoma Chapingo. Como medio básico de cultivo, se utilizaron las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962), suplementadas con 3 % de sacarosa, 0.40 mg·l<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg·l<sup>-1</sup> de mio-inositol, 7 g de agar, a pH de 5.7 ± 0.1, y como reguladores de crecimiento se adicionaron el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y el Tidiazurón (TDZ) en 4 tratamientos (1:1; 1:3, 3:1 y 3:3 mg·l<sup>-1</sup>) con 15 repeticiones en cada variedad. Se evaluaron: incremento de peso y volumen, además del color y textura de

callos, durante dos meses. Los callos obtenidos se incluyeron en 8 tratamientos con 5 repeticiones. Se cuantificó el peso y se estimó el incremento de longitud de los gusanos de seda durante 35 días. El análisis realizado mediante la prueba de Tukey con  $\alpha \leq 0.05$ , mostró que los callos obtenidos en los tratamientos 4 y 2 (3:3 y 1:3 mg·l<sup>-1</sup> de 2,4-D y TDZ, respectivamente) de la variedad SLP5, presentaron las mejores características. Las larvas presentaron diferencias significativas de los tratamientos en las variables estudiadas. Se concluyó que el protocolo para la obtención *in vitro* de callos fue exitoso y puede ser considerado como parte de la dieta en larvas de *Bombyx mori*.

**Palabras clave:** *Morus alba*, cultivo de tejidos, sericultura, alimento, *Bombyx mori*.

## ABSTRACT

The *in vitro* conditions to promote cell dedifferentiation in leaf tissue and cause callusgenesis formation were evaluated in plants of *Morus alba* using SLP5 and SLP3 varieties. The calluses obtained were added to the silkworms' diet, at the Plant Tissue Culture Laboratory at Universidad Autónoma Chapingo. As the basic means inorganic salts, Murashige and Skoog (1962) were used, supplemented with 3 % sucrose, 0.40 mg.l<sup>-1</sup> thiamine , 100 mg.l<sup>-1</sup> myo- inositol , 7 g agar , pH adjusted to 5.7 ± 0.1, and as growth regulators 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and thidiazuron (TDZ) in 4 treatments (1:1, 1:3, 3:1 and 3:3 mg.l<sup>-1</sup>) with 15 replicates in each variety. The evaluated variables were increase in weight and volume, color and texture of callus,

for two months. The obtained calluses were included in 8 treatments with 5 replicates. The weight was measured and the increase in length of silkworms was estimated for 35 days. The analysis conducted by Tukey test with  $\alpha \leq 0.05$ , showed that the calluses obtained in treatments 4 and 2 (3:3 and 1:3, mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D and TDZ, respectively) from the SLP5 variety the best features were presented. The larvae showed significant treatment differences in the studied variables. It was concluded that the protocol for obtaining calluses *in vitro* was successful and may be considered as part of the diet in *Bombyx mori* larvae.

**Keywords:** *Morus alba*, tissue culture, sericulture, food, *Bombyx mori*.

## 1. INTRODUCCIÓN

La morera (*Morus spp*) es un árbol utilizado actualmente en más de 42 países, como alimento para ganado, en jardinería, paisajismo, y medicamentos. Sus múltiples usos han generado un alto nivel de explotación que va desde el familiar hasta el industrial (Sánchez, 2002); sin embargo, el destino principal de su cultivo es el de suministrar hoja para la alimentación del gusano de seda (*Bombyx mori*).

El follaje tiene un alto contenido de proteína cruda y una elevada digestibilidad *in vitro* de la materia seca. Datos de América Central indican contenidos de proteína cruda entre 15 y 25 % y una digestibilidad *in vitro* de la materia seca entre 75 y 90 % lo que implica una calidad igual o superior a la de los concentrados comerciales, siempre y cuando el follaje presente las mejores condiciones de manejo, ya que de no ser así, disminuye la calidad lo cual representa grandes pérdidas (Benavides, *et.al.*, 1993).

Debido a que es una especie caducifolia la práctica de la sericultura disminuye o incluso llega a detenerse durante el periodo de invierno, por lo que es de suma importancia buscar otras alternativas para la obtención de alimento para los gusanos de seda, siendo una de ellas el cultivo *in vitro* de callos de morera (*Morus spp*), puesto que la callogénesis permite la proliferación de células de forma masiva, con características tales que poseen capacidad embriogénica, generalmente se utilizan explantes jóvenes, ya que

éstos son más viables (Acuña, 2004), con el uso adecuado de reguladores de crecimiento (Freire, 2003).

La obtención de callos *in vitro* de *Morus spp* o morera es una alternativa para mantener los estándares de calidad necesarios en la elaboración de alimento y satisfacer las necesidades de la industria sericícola en el afán de mantener estable la producción de seda y con altos niveles de competitividad.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

Establecer condiciones *in vitro*, que permitan la formación de callos mediante el cultivo de lámina foliar de morera (*Morus spp*) como alternativa alimenticia para gusano de seda (*Bombyx mori*).

### **2.2 Objetivos particulares**

Evaluar el efecto de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo para la obtención de callos *in vitro* en dos variedades de morera.

Evaluar la aceptación como alimentación alternativa de los callos obtenidos *in vitro* en larvas *Bombyx mori*.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 Clasificación sistemática y descripción botánica de la morera (*Morus spp.*)

La morera (*Morus spp*) pertenece a División Spermatophyta, Clase Angiosperma, Subclase Dicotiledónea, Orden Urticales, Familia Morácea, género *Morus*, y cuenta con distintas variedades (Machii *et al.*, 2000) entre las que destacan *Morus alba* y *Morus nigra* por su uso como alimento del gusano de seda (Sánchez, 2006).

Es un árbol leñoso, perenne, de porte bajo a medio, de rápido crecimiento, con un sistema radicular profundo. A continuación se describen a detalle las características que lo distinguen.

##### 3.1.1 Hojas

Las hojas son generalmente alternas, pecioladas, simples, íntegras, brillantes y estipuladas de uno a cinco lóbulos con el haz lampiño y el envés ligeramente tomentoso en las axilas de los nervios principales, son de forma ovada a orbicular-ovadas, con ápice agudo o cortamente acuminado, el borde es dentado o irregularmente lobulado, de consistencia blanda, el peciolo es de 12 x 8 cm en las ramas con frutos y 25 x 20 cm en las ramas sin frutos (Sánchez, 2002). Dichas hojas pueden tener más del 46 % de aminoácidos esenciales (Machii, 1992), más del 20 % de proteína cruda y entre el 70 y 80 % de

digestibilidad *in vitro* de la materia seca (Benavides, 1994), además tiene un alto contenido de minerales (hasta 17 % de cenizas), con valores elevados de calcio y fósforo (Figura 1) (Sánchez, 1999).

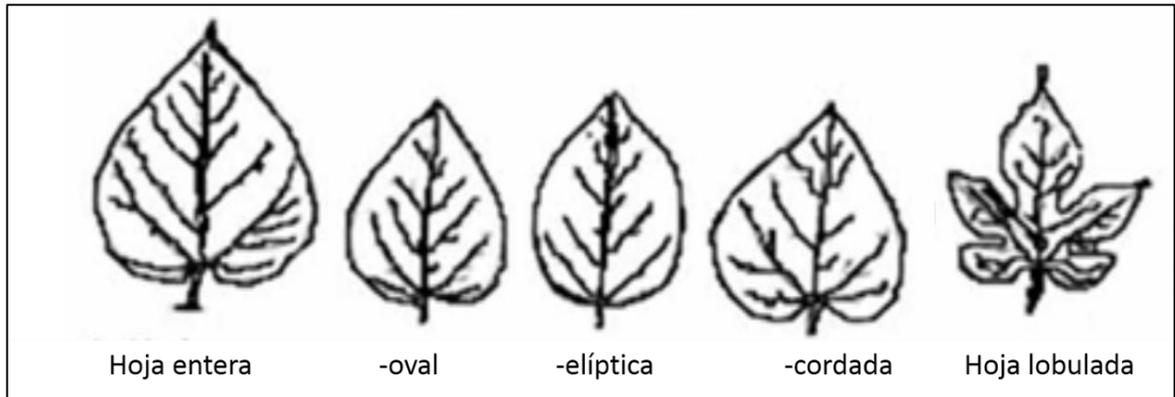


Figura 1. Forma de la hoja de *Morus spp.* Rodríguez *et al.*, 2013.

### 3.1.2 Ramas

Las ramas son tallos en los que se encuentran hojas y yemas que se desarrollan durante el periodo vegetativo, hay una parte a la cual se conoce como nudo y la distancia inter se llama entrenudo, ambos son producto de la división celular en los meristemos apicales de las ramas (Figura 2).

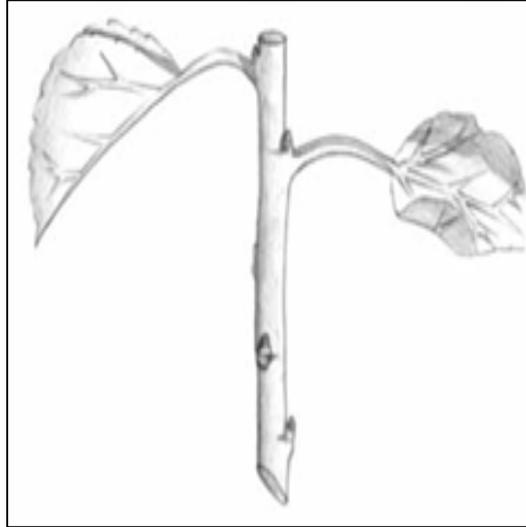


Figura 2. Ramas de *Morus spp* (Rodríguez *et al.*, 2013)

### 3.1.3 Inflorescencia

La inflorescencia es simple, axilar, en amentos de color crema o verdosos, con pedúnculo colgante, flores con sexos separados, es decir, en una misma flor nunca se encuentran juntos los dos órganos sexuales (masculinos y femeninos). Las flores están dispuestas en espigas densas de hasta dos centímetros de largo, con cuatro sépalos, son poco vistosas y la polinización ocurre generalmente por la acción del viento (figura 3) (Rodríguez *et al.*, 2013).

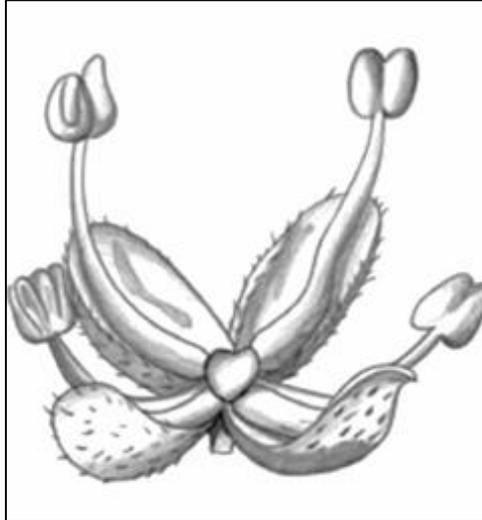


Figura 3. Inflorescencia de *Morus spp.* (Rodríguez *et al.*, 2013)

### 3.1.4 Fruto

Los frutos tienen forma cilíndrica, algunos no forman semillas, a este fenómeno se le llama partenocarpia. Un gramo de fruto contiene de 500 a 1000 semillas. El color de los frutos es variable, de acuerdo al grado de maduración y variedad de la especie, siendo desde blanco verdoso hasta rojo oscuro o morado. Son ricos en minerales, vitaminas y azúcares, lo que indica que son una adecuada materia prima para la industria alimenticia y farmacéutica (Figura 4) (Rodríguez *et al.*, 2013).



Figura 4. Frutos de *Morus spp.*

### **3.1.5 Requerimientos ambientales**

#### **3.1.5.1 Altitud**

La morera se adapta desde los 0 hasta los 4000 msnm dependiendo de la latitud (Soo-Ho *et al.*, 1990), siendo de 500 a 1500 msnm el rango óptimo para su desarrollo (Rodríguez *et al.*, 2013).

#### **3.1.5.2 Suelo**

Es bastante adaptable, sin embargo no tolera suelos de mal drenaje ni compactados, requiere fertilización y aplicación de productos químicos para evitar la contaminación de plagas y enfermedades que disminuyan su rendimiento (Sierra, 2006).

### **3.1.5.3 Temperatura**

El rango de temperaturas que tolera este cultivo van desde 18 hasta 38 °C (Sierra, 2006), se considera como la óptima de 30 a 32 °C (Rodríguez *et al.*, 2013).

### **3.1.5.4 Precipitación**

Para el óptimo desarrollo de la morera son suficientes precipitaciones de 600 a 2500 mm distribuidas a lo largo del año, no es recomendable plantar en zonas con precipitaciones bajas ya que este cultivo es muy sensible a los cambios ambientales extremos.

### **3.1.5.5 Humedad relativa**

Este cultivo necesita una humedad relativa de 65-80 % (Sierra, 2006), pues la planta presenta baja resistencia a sequía o abundante humedad.

### **3.1.5.6 Luminosidad**

Este cultivo requiere de suficiente luz para su óptimo desarrollo, de lo contrario se obtienen hojas delgadas, sin brillo, deficientes de nutrientes.

### **3.1.6 Propagación**

La propagación puede realizarse por semilla, acodo, injerto y estaca, aunque la más utilizada es por estaca, las ventajas de la reproducción vegetativa son la garantía de las características productivas, la facilidad de obtención de material y la facilidad de siembra (Sánchez, 2002); sin embargo, se debe tomar en cuenta la fuente del material vegetativo, los materiales para enraizamiento, tratamientos con estimuladores de enraizamiento y condiciones ambientales adecuadas, en la variedades Chinese White y Kokuso-27 de *Morus alba* el injerto no es económicamente viable, por el amplio requerimiento de mano de obra y el periodo para tener plantas productivas es de 4 o 5 años, los esquejes tampoco son viables puesto que éstos no tienen gran capacidad de enraizamiento, es por esta razón que el cultivo de tejidos es una alternativa superior para la multiplicación de la morera (Bhau *et al.*, 2001).

### **3.1.7 Fertilización**

Para obtener hojas de excelente calidad se debe tener en cuenta la aplicación de fuentes fertilizantes, ya que este cultivo extrae grandes cantidades de nutrientes, entre los más esenciales se encuentran el nitrógeno para tener hojas gruesas, jugosas y nutridas, el fósforo para fortalecer las raíces, el potasio para resistencia a enfermedades fungosas. Para este fin puede recurrirse a la fertilización química u orgánica.

### **3.1.8 Manejo de plagas y enfermedades**

Las plagas más comunes de la morera son el barrenador de tallo (*Epialus spp.*), la chinche harinosa (*Panonychus citru MCG.*), cochinilla escamosa, áfidos o pulgones (*Aphis sp.*), mosca de la fruta, chinches chupadoras de hojas y frutos; en cuanto a enfermedades, las más comunes son Mildiu polvoriento ocasionado por *Phyllactinia moricola*, pudrición de la raíz que puede ser causado por *Verticilium sp*, *Fusarium sp.* o *Rosellina sp*, Roya bacteriana causada por *Pseudomonas mori* (Cruz, 1993). Para evitar la presencia de estas plagas y enfermedades es necesario tener sumo cuidado en no causar heridas a las plantas ya que son una manera en que se introducen los agentes patógenos, mantener limpia de malezas a la plantación y tener sumo cuidado en la aplicación de agroquímicos para evitar la presencia de plagas y enfermedades.

### **3.1.9 Usos**

En su país de origen la morera se utiliza únicamente como alimento de gusanos de seda (*Bombyx mori*) y el fruto para consumo humano, sin embargo, a través del tiempo se ha aprovechado también por sus tallos comestibles, además de sus propiedades medicinales (Cepeda, 1991) y en las últimas décadas se desarrollaron un conjunto de investigaciones relacionadas con la agrotecnia, conservación, nutrición y producción animal en ovinos, caprinos, conejos, cerdos y bovinos (Milera *et al.*, 2003).

### **3.2 Gusanos de seda (*Bombyx mori*)**

Históricamente el manejo de *Bombyx mori* ha sido para la producción de seda, con la que se confeccionaban prendas de vestir originalmente en la India, posteriormente se extendió por toda la costa Mediterránea (Cifuentes y Kee-Wook, 1998)

#### **3.2.1 Clasificación taxonómica**

Pertenece a la Clase *Insecta* o *héxapoda*, Orden *Lepidóptera*, Familia *Bombycidae*, Género *Bombyx*, Especie *mori*, y su Nombre vulgar es Gusano de seda (Salice *et al.* 2001)

#### **3.2.2 Razas**

Actualmente existen diversas razas de gusanos de seda (Figura 5) que se adaptan a diferentes condiciones climáticas clasificadas de acuerdo a los ciclos de reproducción que presentan, en monovoltinos con un ciclo anual, en ésta se encuentran variedades *Japonesas*, *Chinas*, *Indias*, *Españolas* que se adaptan a regiones con veranos cortos, destacan por la calidad de los capullos que ofrecen, sin embargo su rendimiento es bajo y son muy propensas a enfermedades. La siguiente raza se conoce como bivoltina por reproducirse dos veces al año, se desarrollan mejor en áreas cálidas, pero el rendimiento de seda es bajo y su calidad es inferior que los monovoltinos. La última raza es Polivoltina que se reproduce más de dos veces al año (4 o 5), los capullos

son de baja calidad pero se adaptan muy bien en lugares húmedos con temperaturas elevadas (Padilla *et. al.*, 2003).



Figura 5. Razas de gusanos de seda.

### 3.2.3 Ciclo de vida

Se ha observado que el ciclo de vida de los gusanos de seda tiene cinco edades, situándose cada una de ellas entre dos procesos de muda. Al nacer miden alrededor de 3 mm, pesan 0.5 mg, poseen una cutícula con vellosoidad pronunciada, la primera muda sucede después de 6-7 días, la segunda de 5 a 7 días después de la primera, la tercera a la semana de la segunda, la cuarta de los 8 a 10 días de la tercera, la quinta y última dura de 9 a 12 días aproximadamente, en ésta las larvas alcanzan una longitud de hasta 12 cm y pesan en promedio 5 g, y comienza la elaboración de capullos para convertirse en crisálidas o ninfas, al cabo de 15-20 días rompen el capullo para salir convertidas en mariposas, las cuales se caracterizan por poseer cuatro alas funcionales y su cuerpo cubierto de vellosoidad. Se nota una marcada diferencia

entre hembras y machos, las primeras son de mayor volumen, con alas más pequeñas y un abdomen más desarrollado donde se encuentran los huevecillos dispuestos a ser fecundados y así continuar con el ciclo de vida (Padilla *et. al.*, 2003).

#### **3.2.4 Condiciones ambientales para el manejo de gusanos de seda**

El manejo de las orugas debe iniciar con la adecuada cantidad de morera y contar con una producción de ésta, ya que, como se ha citado antes, la morera es el único alimento para los gusanos de seda, es importante considerar que la mejor morera para este propósito es *Morus alba*, aunque se ha ensayado con plantas sustitutas como morera de papel (*Maclura aurantica*), sin embargo, los resultados no han sido mejores ya que los capullos son de baja calidad. La cantidad de hojas necesaria para todo el ciclo de vida de los gusanos de seda varía de acuerdo a la edad en la que se encuentren, se estima que 28-30 g de huevos (40000 gusanos) consumen aproximadamente 1200 kg de hojas, divididos en las etapas, siendo en la primera un consumo de 3 a 10 kg, en la segunda de 12 a 30 kg, en la tercera de 50 a 80 kg, en la cuarta 200-220 kg, y en la última se consumen alrededor de 900 kg de hojas (Padilla *et. al.*, 2003).

Otro punto a considerar es el lugar para la cría de los gusanos, éste debe ser únicamente para el desarrollo de las larvas, tener buena ventilación, luz, temperatura adecuada, limpieza y material adecuado para que la construcción de los capullos sea independiente y ordenada.

### 3.2.5 Sanidad

En cuanto a sanidad de los gusanos de seda, no existen tratamientos apropiados para las enfermedades que los afectan, por eso las medidas profilácticas son lo más adecuado. Algunas enfermedades son:

Muscardina, causada por el hongo *Bauveria bassiana* o *Botrytis bassiana* mostrando un cambio en la coloración llegando a putrefacción total, se dispersa fácilmente ya que las esporas se transportan por el aire dándose en una semana la contaminación total de la población larval.

Pebrina, producida por el protozoo *Nosema bombyx*, los gusanos pierden el apetito, comienzan a presentar manchas de color negro que cambian a un color rojo.

Flacidez, su agente causal no se ha determinado y no se considera contagiosa más bien es de origen metabólico, se presenta después de la cuarta muda, también pierden el apetito, detienen su crecimiento, sus movimientos son lentos, la piel se torna oscura y la flacidez aumenta.

Una enfermedad más es la palidez grasa o amarilla, causada por un virus desde la tercera muda, los gusanos se tornan amarillos o blanco lechoso, pierden al apetito, sus movimientos son nulos, posteriormente aumentan de volumen, segregando un líquido amarillento viscoso de mal olor. Además de las señaladas existen otros agentes contaminantes como hongos e insectos que dependiendo del manejo se pueden controlar fácilmente (Padilla *et. al.*, 2003).

### **3.2.6 Formación y colecta de capullo de seda**

La formación del capullo inicia cuando los gusanos segregan de su aparato bucal un líquido viscoso que con el aire se convierte en un filamento sólido llamada borra (primera seda) de baja calidad y sirve para sujetarse, luego continúan tejiendo el capullo hasta que se cubren totalmente. Para la recolección de capullos se debe determinar que la crisálida esté formada (7-8 días), y no deben pasar más de 10 o 12 días desde que los capullos se forman para recolectarse, ya que a los 15-20 días, dependiendo de la raza, comienzan a salir las mariposas.

### **3.3 Obtención de la seda**

La seda es una de las fibras naturales de mayor resistencia con un diámetro que oscila entre 8 a 12 micrones, superando la fibra de acero del mismo diámetro; sin embargo pierde 20 % de su resistencia cuando está húmeda.

La seda se constituye por sericina y fibroína, la cual le da sus peculiares características. La proteína fibroína está compuesta por tres aminoácidos enlazados por cadenas de hidrógeno: serina, alamina y glicina, siendo ésta última la más abundante y, al ser uno de los aminoácidos de cadena más reducida, permite una condensación muy alta de moléculas, dando como resultado fibras más resistentes y fuertes. La fibroína es producida por el centro y es recubierta por sericina, una proteína amorfa extremadamente pegajosa. La resistencia de la fibroína, y la compactación y cementación con

que aporta la sericina, permiten la formación del capullo con un solo hilo. Además, la sericina es soluble en agua, de manera que al sumergir el capullo en agua, se torna muy fácil obtener un solo hilo de seda formado primordialmente por fibroína.

Para obtener un filamento de seda, se debe evitar la emergencia de las mariposas, un método empleado para este fin es la desecación de los capullos por calor a temperatura de 55 y 90 °C durante 14 horas aproximadamente, en este proceso hay que tener sumo cuidado para no deteriorar la calidad de la seda, posteriormente se seleccionan los capullos desechando los que presenten manchas, dobles, débiles, vidriosos, delgados o calcinados, eligiendo solo los satinados flexibles.

El filamento obtenido de cada capullo dependiendo de la raza de los gusanos varía de 300 a 400 m, aunque algunos autores citan que se obtienen hasta 1000 m, no todo el filamento es de buena calidad.

### **3.4 Actividad sericícola**

Los países con mayor importancia en la sericultura son China, India y Brasil. Japón fue un país que ha ido disminuyendo sus superficies de cultivo de la morera a tal grado que ha cerrado fábricas de este ramo, aunque sigue siendo un referente en el campo de la investigación y capacitación sericícola.

En México son cuatro los estados que se dedican a la sericultura, Oaxaca es el más importante puesto que cuenta con una cultura ya establecida, seguido de San Luis Potosí donde se encuentra el Centro Nacional de Sericultura, Michoacán e Hidalgo son los estados donde recientemente se ha iniciado la elaboración de productos artesanales a partir de la seda obtenida en dichos sitios.

Datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en su publicación “La industria textil y del vestido en México 2013 (Series estadísticas sectoriales)”, indican que México no figura como exportador importante de seda, en la figura 6 se observa en resumen la actividad sericícola mexicana.

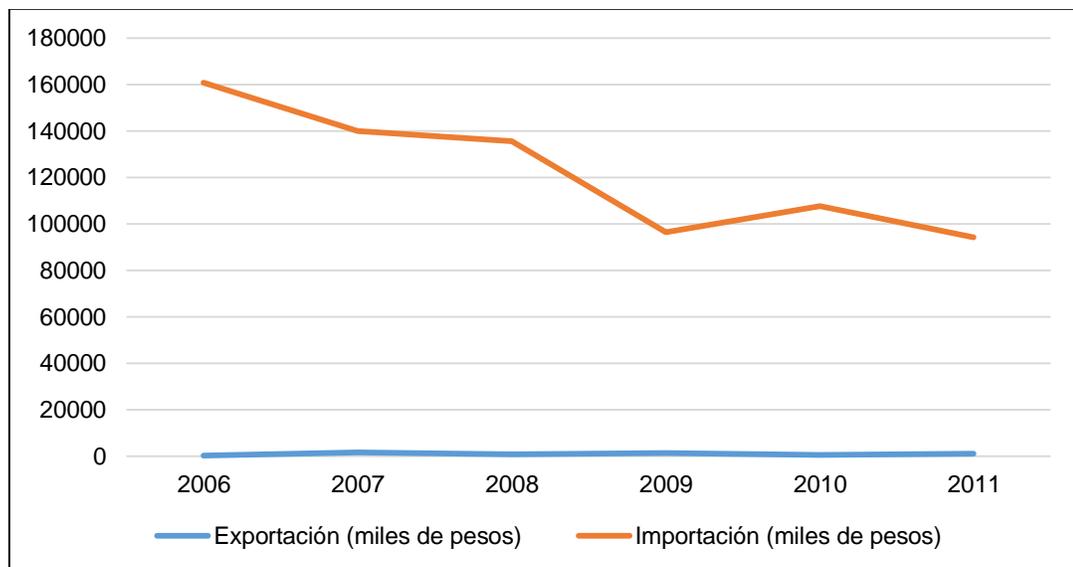


Figura 6. Actividad económica de la sericultura en México. Fuente INEGI, Anuario Estadístico del comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos (varios años).

Los productos de exportación son: desperdicios de seda (incluidos los capullos no aptos para el devanado, desperdicios de hilados e hilachas), hilados de seda (excepto los hilados de desperdicios de seda) sin acondicionar para la venta al por menor y tejidos de seda o de desperdicios de seda a países como Estados Unidos, Italia, Perú y otros. La importación incluye la seda cruda (sin coser) y los mismos productos de exportación; los países de los que se importa son Alemania, República de Corea, España, Estados Unidos, Francia, India, Italia, Reino Unido, Tailandia, Uruguay y otros. La importación y exportación incluyen la industria maquiladora.

### **3.5 Costos de producción de hilo de seda**

Los rendimientos y ganancias reflejadas en la economía familiar varían de acuerdo al manejo agrotécnico de la morera y los cuidados que se le den a la población de los gusanos de seda.

Gama (2008) citado por Garfias (2008) menciona que en una unidad familiar con 20000 gusanos de seda (1 caja), se necesitan 280 plantas en un área de 250 m<sup>2</sup>, para obtener 30 kg brutos de capullo, resultando solo 12 kg de capullo seco con las condiciones adecuadas para formar hilo, lo que genera 4.8 kg de seda cruda, necesario para formar 3.6 kg de hilo, cada kg de hilo de seda es vendido a un precio estimado de \$ 2625.00 pesos, esto significa que en una temporada de producción pueden obtenerse ingresos de \$ 9450.00 pesos,

entiéndase por una temporada de producción los días que dura el ciclo biológico del gusano de seda (Cuadro 1).

En tanto se mantenga un adecuado manejo del cultivo de morera que garantice el suministro de alimento (hojas) la producción de gusano de seda puede mantenerse hasta por 90 días, ya que la época de cosecha de hojas solo tiene una duración de tres meses, motivo por el cual se propone el uso de la técnica de cultivo de tejidos *in vitro* de *Morus sp* para tener una producción continua de seda y satisfacer las necesidades nacionales de mercado hasta llegar a la exportación de hilo y productos de seda con alta calidad ante el consumidor final.

**Cuadro 1. Estimación de ingresos económicos anuales, obtenidos a partir de la venta de hilo de seda.**

Unidad de producción familiar	Temporada de producción/año	Superficie (m <sup>2</sup> ) establecida con <i>Morus</i>	Número de plantas	Población de gusanos de seda (cajas)	Producción (kg) de capullo de seda	Capullo de seda seco (kg)	Seda cruda (kg)	Kg de Hilo de seda	Precio de Kg de hilo (\$)	Ingreso económico bruto (\$)
1	1	250	280	1	30	12	4.8	3.6	2625	9450
20	3	5000	5600	20	1800	720	288	216	2625	567000

### **3.6 Características generales del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales**

El cultivo *in vitro* de tejidos es un sistema de crecimiento de muchas células no diferenciadas, de origen diferente con la capacidad de regenerar nuevas plantas. En algunos casos el proceso se inicia con la producción de células en forma de callos, éstos pueden generarse de diferentes tejidos de la planta (hojas, tallos, raíces, yemas); la importancia de los callos radica en la totipotencia ya que poseen información genética significativa y sobre todo por la capacidad de regenerar una planta con órganos diferenciados (González, *et al.*, 2000).

Los primeros experimentos en relación al cultivo de tejidos datan de 1902, sin embargo no fue hasta 1922 que Knudson logró con gran éxito la germinación de semillas de orquídeas de *Clatteya* y *Epidendrum* en un medio estéril que contenía sales minerales y azúcar. El primero en cultivar tejidos vegetales fue White en 1934 a partir de ápices de raíces de jitomate en medios con sales y azúcar enriquecidos con extractos de levadura.

#### **3.6.1 Técnicas *in vitro***

##### **3.6.1.1 Propagación clonal**

Se refiere a la obtención de un individuo con la misma información genética, esta técnica envuelve diferentes rutas como la multiplicación de yemas, la

organogénesis directa o indirecta, embriogénesis somática, microinjerto y el cultivo de embriones y esporas.

#### **3.6.1.2 Suspensiones celulares**

Consiste en la distribución de células libres y agregados celulares en un medio en movimiento, pueden ser permanentes mediante el continuo suministro de nutrientes, inician generalmente con segmentos de callos.

#### **3.6.1.3 Protoplastos**

Son células desnudas que poseen la capacidad para producir un organismo altamente diferenciado, esta característica es única de los protoplastos de plantas superiores. Debido a la ausencia de la pared celular, los protoplastos son adecuados para manipulaciones genéticas que no serían posibles con plantas o células intactas (Szabados, 1991).

#### **3.6.1.4 Anteras**

El cultivo de anteras es usado para la inducción de haploides, aunque en algunas especies sucede una duplicación de los cromosomas en las etapas de desarrollo del callo y de regeneración de la planta (Roca *et al.*, 1991)

### **3.6.1.5 Embriones y óvulos**

Se ha desarrollado como otra alternativa para realizar cruzamientos y solucionar los problemas de autoincompatibilidad. Se ha usado exitosamente en la obtención de híbridos provenientes de cruzamientos interespecíficos e intergenéricos, en los cuales el endospermo no se desarrolla normalmente (Litz, 1991).

### **3.6.2 Micropropagación**

Consiste en cultivar fracciones de diferentes explantes, es decir, una multiplicación masiva *in vitro*.

#### **Fase 0: Colecta y preparación del material vegetal**

La colecta del explante se realiza después de identificar y acondicionar plenamente la planta donante, considerando el órgano que sirve como explante, la edad ontogénica y fisiológica de éste, la estación de colecta y el estado sanitario general de la planta (Olmos *et al.*, 2004).

#### **Fase I: Establecimiento de cultivo**

El éxito de esta fase depende del control, la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes (Olmos *et al.*, 2004) y que tengan una reacción ya sea crecimiento de brotes o formación de callos (Montoya, 1991). El cultivo se considera establecido cuando se determina que aparentemente esté libre de patógenos u otros contaminantes.

## **Fase II: Multiplicación**

El objeto de esta fase es obtener la multiplicación de órganos y estructuras para producir nuevas plantas. En la mayor parte de las especies, el método de multiplicación más utilizado es la organogénesis adventicia, lo cual permite un incremento rápido y sustancial de los propágulos. La multiplicación por brotes axilares, embrionarios u órganos de almacenamiento (Montoya, 1991).

## **Fase III: Enraizamiento**

Esta etapa implica el enraizamiento de los brotes, aclimatación para la tolerancia a la humedad, Alonso (2002) refiere que las raíces que se desarrollan *in vitro* pueden no ser funcionales y las posibilidades de que se dañen durante el trasplante son muy altas aumentando las posibilidades que produzcan enfermedades en las raíces y tallo.

## **Fase IV: Aclimatación en ambiente material**

Esta es la última fase de la micropropagación donde las plantas se colocan en un ambiente controlado, regulando intensidad lumínica, temperatura y fotoperiodo de acuerdo a las necesidades del cultivo.

### **3.6.2.1 Ventajas de la micropropagación**

En comparación con los métodos convencionales las ventajas de la micropropagación son notables como el rápido incremento del número de plantas en una superficie pequeña en menor tiempo, se tiene mayor control

sanitario, facilidad de transporte, menores restricciones de exportación, y sobre todo la multiplicación de ejemplares en peligro de extinción (Villalobos y Thorpe, 1991).

### **3.6.2.2 Desventajas de la micropropagación**

La contaminación por factores endógenos y ambientales es la causa de grandes pérdidas económicas, además de una alta variación somaclonal, se pueden obtener variantes genética o epigenéticas por mala selección de planta madre o por errores en cualquier fase de la micropropagación; lo anterior puede llevar a una pérdida total de material durante la aclimatación de las plantas obtenidas *in vitro* sin olvidar los elevados costos de producción.

### **3.7 Medios de cultivo**

El cultivo *in vitro* de una planta está determinado por el material vegetal y las condiciones físicas y químicas creadas artificialmente, las primeras se refieren a las condiciones de la planta, y las condiciones químicas están establecidas por los nutrientes, agua, azúcar, micro y macro elementos, reguladores de crecimiento, vitaminas y agar entre otros, que utilizados de manera óptima originan el desarrollo de los explantes.

Un medio de cultivo debe contener vitaminas, carbono, nutrimentos minerales, agente gelificante (en caso de medios semisólidos), reguladores de

crecimiento y otros compuestos necesarios para el desarrollo del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

### **3.7.1 Vitaminas**

Las vitaminas son necesarias en una serie de reacciones catalíticas del metabolismo y crecimiento de las plantas, algunas de ellas son las del complejo B, entre las más utilizadas en el cultivo de tejidos se encuentran:

Tiamina (vitamina B1): Utilizada en el proceso de respiración de la planta, es una vitamina esencial que se requiere en casi todos los cultivos.

Riboflavina (vitamina B2): Ayuda en la metabolización de carbohidratos y en la respiración celular.

Acido nicotínico (niacina o vitamina B3): Estimula el crecimiento de las plantas a través de su participación como componente de coenzimas que actúan en las reacciones de energía.

Adenina (vitamina B4): Es parte integral del ADN y el ARN en el núcleo de la célula. También actúa como citocinina pero de una manera muy débil; se utiliza como sulfato de adenina para la promoción y formación de brotes.

Ácido pantoténico (vitamina B5): Actúa como coenzima en el metabolismo de grasas. Se agrega al medio en forma de pantotenato de calcio.

Piridoxina (vitamina B6): Al igual que el ácido nicotínico estimula el crecimiento de las plantas actuando en las reacciones de energía.

Ácido ascórbico (vitamina C): Se utiliza como antioxidante para prevenir la oxidación de compuestos fenólicos.

Tocoferol (vitamina E): Para mejorar y promover la dispersión en cultivos en suspensión.

Biotina (vitamina H): Utilizada en el metabolismo de grasas, proteínas y carbohidratos.

Inositol o myo-inositol: Es un azúcar-alcohol incluido dentro del complejo de la vitamina B. Es parte integral de varios tipos de membranas de algunos organelos como los cloroplastos.

Ácido fólico (vitamina Bc o M): Tiene funciones de vitamina B y tiene actividad de coenzima.

### **3.7.2 Myo-inositol**

El Myo-inositol es un azúcar- alcohol que tiene un efecto estimulante sobre la morfogénesis ya que está involucrado en la síntesis de fosfolípidos, pectinas en la pared celular y en las membranas citoplásmicas.

### 3.7.3 Fuentes de carbono

La sacarosa y glucosa son fuente de carbono necesarias para el cultivo de tejidos vegetales. Se pueden utilizar otros azúcares pero son menos eficientes (Ledezma, 1994).

### 3.7.4 Reguladores de crecimiento

La adición de hormonas al medio de cultivo puede incrementar significativamente la diferenciación de órganos (Radise, 2004), las más utilizadas son auxinas, citocininas, giberelinas y ácido abscísico y su función se describe a continuación:

**Auxinas.** Estimulan la división celular, promueven la elongación celular y expansión de los tejidos, actúa en la formación de raíces adventicias, inhiben la formación de los vástagos axilares y adventicios, y frecuentemente promocionan la embriogénesis en los cultivos en suspensión, las auxinas son utilizadas por su participación en la estimulación del alargamiento celular a bajas concentraciones o su depresión en altas concentraciones, las principales son el ácido indolacético (AIA) por tener pocos efectos adversos sobre la organogénesis , el ácido indolbutírico (AIB), el ácido naftaleno-acético (ANA), el ácido p-clorofenoxiacético (CPA), y el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D).

**Citocininas:** Estimulan la división celular, formación y crecimiento de yemas, promueven la formación de brotes axilares, retardan el envejecimiento y en

concentraciones elevadas pueden inducir la formación de brotes adventicios e inhibir la formación de raíces (Alonso, 2002). Las citocininas más comunes son la cinetina, la N6-bencilaminopurina (BAP), la zeatina y el 6-( $\gamma$ ,  $\gamma$ - dimetilamino) purina (2iP).

**Giberelinas:** Inducen la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemas o yemas *in vitro*, puede romper la dormancia de embriones aislados y de brotes e inhiben la formación de raíces y vástagos adventicios, la giberelina más utilizada es el ácido giberélico (AG3) (Alonso, 2002).

**Ácido abscísico (ABA):** A diferencia de las hormonas anteriores muestra efectos inhibitorios del desarrollo, aunque en algunos casos, se encuentra en los puntos de crecimiento en altas concentraciones, lo que indica alguna actividad de estimulación del crecimiento; además presenta gran influencia sobre la permeabilidad de las membranas celulares y en la expresión de los genes (Bautista *et al.*, 2010).

Otros reguladores como la adenina o el sulfato de adenina frecuentemente favorecen la formación de tallo *in vitro*. Las bases nitrogenadas (ácido citidílico y guanílico) promueven el crecimiento de cultivos de callo, el ácido málico se ha empleado en algunos medios para el cultivo de algunos embriones (Krikorian, 1991).

### **3.7.5 Aminoácidos y amidas**

La L-serina es muy importante en la iniciación de embriones haploides en cultivos de anteras, otros importantes son L-arginina, ácido L- aspártico, L- asparagina, ácido L- glutámico y L- glutamina.

Como fuente de aminoácidos se usa caseína hidrolizada (fuente de nitrógeno orgánico), el jugo de naranja (ácido cítrico), la pulpa de plátano y la emulsión de pescado se usan principalmente en los medios para cultivos de orquídeas, mientras que el endospermo del coco (complejo de elemento orgánicos e inorgánicos), extracto de malta, extracto de levadura (fuente natural de vitaminas), extracto de tubérculos de la papa tienen un uso más general (Montoya, 1991).

### **3.7.6 Agente gelificante**

Es el elemento de soporte utilizado en el cultivo de tejidos, proporciona a la preparación del medio de cultivo una consistencia que sirve como soporte al inóculo, el más utilizado es el agar, éste es un polisacárido derivado de extractos de varias especies de algas rojas, con un alto peso molecular y con la capacidad de gelatinizar un medio de cultivo. Aunque es considerado como un material inerte, el agar natural contiene cantidades mínimas de algunos elementos por lo que se le considera como un compuesto químicamente indefinido. La calidad del agar depende de varios factores, entre ellos, la época del año en que el alga ha sido colectada, el nivel de contaminantes, el proceso

de manufactura y la manera en que el producto ha sido purificado. Cualquier nivel de impurezas en el agar puede tener efecto en la respuesta del cultivo *in vitro*.

### **3.7.7 Formulaciones básicas en medios de cultivo**

Algunas formulaciones básicas de los medios de cultivo se muestran en el cuadro 2, generalmente el medio de cultivo más utilizado es el propuesto por Murashige y Skoog (1962).

**Cuadro 2. Composición de cuatro medios másicos para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.**

Componentes	Contenidos (mg/l)			
	MS	B5	N6	Wh
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	-	-	-
KNO <sub>3</sub>	1900	2500	2830	80
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	-	400	-
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	150	166	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	250	185	7.37
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	134	463	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	-	-	288
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-	150	-	19
KCl	-	-	-	65
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	200
KI	0.83	0.75	0.80	0.75
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20	3	1.60	1.50
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-	10	-	-
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.30	-	4.40	6.65
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.60	2	1.50	2.67
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	-	-
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	-	-	-	0.001
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	-	0.01
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	-	-	-	2.50
FESO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.80	27.80	27.85	-
Na <sub>2</sub> EDTA	37.30	37.30	37.25	-
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	-	-
Glicina	2	-	2	3
Tiamina-HCl	0.10	10	1	0.1
Pridoxina-HCl	0.50	1	0.50	0.1
Ácido nicotínico	0.50	1	0.50	0.50
Mioinositol	100	100	-	100
Sacarosa	30 000	20 000	50 000	20 000
pH	5.7	5.5	5.8	5.5

MS: Murashige *et al.*, 1962; B5: Gamborg *et al.*, 1968; N6:Chu *et al.*, 1975; Wh: White, 1943 con modificaciones de Yeoman *et al.*, 1977 y Singh *et al.*, 1981.

### 3.8 Contaminación *in vitro*

Existen contaminantes que afectan el cultivo *in vitro*, se clasifican en tres principales grupos, el primero es la presencia de microorganismos en el interior o en la superficie de los explantes, el segundo se refiere a errores en el manejo de éstos y el tercer grupo es por errores del operador.

Los microorganismos pueden ser capaces de crecer en el medio de cultivo, aunque algunos pueden ser inhibidos por la alta concentración de sales o azúcar y el pH, algunos pueden crecer en el tejido después de ser transferidos a un medio de cultivo fresco, especialmente si el medio tiene una baja concentración de sales o azúcar, los hongos patógenos más comunes en la contaminación *in vitro* son *Botrytis*, *Alternaria*, *Penicillium* y *Aspergillus*. Las bacterias (micoplasmas, spiroplasmas y rickettsias), los virus y viroides son patógenos obligados de plantas y no pueden persistir (o sólo por períodos limitados de tiempo) fuera de sus plantas huéspedes. Algunas especies pueden ser transmitidas manualmente o por ácaros y trips que son descritos como vectores de hongos, levaduras, bacterias, virus y micoplasmas *in vivo*.

El manejo de los explantes en todo el proceso del cultivo *in vitro* es muy delicado, comenzando por la colecta del material vegetal, el transporte y la esterilización, que depende del tipo de explante y la especie vegetal utilizada, semillas o segmentos nodales pueden ser tratados directamente con agentes esterilizantes, mientras que óvulos inmaduros y embriones tienden a ser dañados fácilmente por desinfectantes (Benson, 1999). Otros puntos a

considerar son la oxidación de los tejidos y del medio, la concentración de sustancias en los tejidos y en el medio, el tamaño mínimo del explante, cantidad de células por unidad de volumen del medio para la iniciación del cultivo.

Los errores del operador pueden suceder en cualquier momento a partir de la manipulación del vegetal para extraer el explante, en la medición de soluciones para esterilizar, la limpieza de la superficie para todo el proceso de cultivo *in vitro*. Es recomendable que el operador limpie sus manos y brazos con alcohol, usar una bata de laboratorio limpia, cuidando que su respiración no llegue a los explantes evitando con esto la contaminación (Abdelnour, 1994).

### **3.9 Ventajas y desventajas del cultivo *in vitro* en tejidos vegetales**

El cultivo de tejidos vegetales ofrece ventajas importantes que se enumeran a continuación:

- 1) Aumenta oportunidades para obtener variedades resistentes a las enfermedades
- 2) Resuelve el inconveniente de no disponer de estructuras florales para los cruzamientos así como los de incompatibilidad sexual.
- 3) Permite seleccionar clones resistentes a enfermedades y mutantes con buenas características agronómicas

- 4) Realizar cultivo de meristemos y procedimientos inmunológicos para obtener materiales vegetales libres de patógenos como medida de cuarentena.
- 5) Permite el desarrollo de nuevos materiales genéticos
- 6) Permite obtener plantas sanas, libres de enfermedades como la roya, el virus del mosaico y el raquitismo del retoño.
- 7) Permite obtener callos, regenerando plantas a partir de protoplastos
- 8) Se obtienen variedades resistentes a ciertos productos químicos como herbicidas y otras sustancias (Subirós, 2000)

Entre las desventajas se pueden citar:

- 1) Las técnicas cualquiera que se use para el cultivo *in vitro* debe llevarse a cabo con estricta asepsia por la posible contaminación de hongos, bacterias y levaduras
- 2) Variación somaclonal por una deficiente selección del material vegetal
- 3) Pérdida de material durante la aclimatación de las plantas obtenidas *in vitro*
- 4) Elevados costos de producción (Altman, 1989).

### **3.10 Importancia de la callogénesis**

Un callo puede definirse como un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, que sufren una desdiferenciación celular, presentando una proliferación continua y acelerada, con una apariencia desorganizada, que da por resultado una masa amorfa de tejido. Costabel (1984) menciona que un callo es un tejido no organizado con la proliferación de células parenquimatosas. Con la regeneración de los callos se puede mostrar el aislamiento meristemático o aislamiento de individuos o grupos de traqueidas y células pigmentadas.

La característica más importante de los callos es la totipotencia de sus células, ya que poseen información genética significativa, es decir, tienen la capacidad de formar plántulas completas (Hurtado, 1989) a partir de un adecuado manejo ambiental, nutricional y hormonal. En genética son utilizados para introducir genes de la misma especie, entre especies o géneros diferentes. Otra característica del tejido calloso es la friabilidad que presentan, es decir, la tendencia de las células a separarse entre sí.

Para la obtención de los callos, las auxinas y los reguladores del crecimiento más utilizados son el ácido indol-3-acético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2,4-D), encontrándose para cada especie, una auxina o un regulador del crecimiento y una concentración óptima para la inducción y mantenimiento del callo.

El desarrollo de un callo comienza con la inducción, donde las células del inóculo o explante comienzan su crecimiento, continua la proliferación celular por lo tanto sucede aumento de la masa celular, posteriormente se induce la diferenciación celular para obtener tejido meristemático apical, radical, embrionario y/o vascular, para finalizar en el envejecimiento con la pérdida de la capacidad de crecimiento acelerado.

El tiempo necesario para la obtención de un callo varia de 3 a 8 semanas, según el propósito puede realizarse subcultivos en nuevos medios transfiriendo segmentos de callos sanos en lapsos de 2 a 6 semanas para evitar el debilitamiento, la intoxicación y la muerte del tejido. El crecimiento, desarrollo y multiplicación de los callos es muy acelerado e intenso provocando el inminente gasto de nutrientes del medio de cultivo, la acumulación de metabolitos de desecho celular llegando a ser tóxicos para el tejido calloso.

La primera aplicación del cultivo *in vitro* de callos, fue en el arroz considerado el primer cereal en ser regenerado *in vitro* por callo, seguido por el sorgo. La regeneración de plantas del mijo se reportó más tarde (Tomes, 1985).

Villalobos *et al.* (1987) indujeron y multiplicaron callos *in vitro* en tres cultivares comerciales de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) hasta obtener plantas que posteriormente se desarrollaron en campo.

Jiménez y Guevara (1995) realizaron el cultivo *in vitro* de callos a partir de embriones inmaduros de naranja dulce (*Citrus sinensis* en los cultivares

Acosta 6 y Washington Navel) y naranja agria (*Citrus aurantium* L.) situados en Costa Rica con la finalidad de regenerar mediante embriogénesis dichas variedades.

Existen muchos casos en los que la callogénesis es de suma importancia y punto de partida para la conservación de especies en peligro de extinción y de gran valor botánico.

### **3.11 Cultivo *in vitro* de morera**

Se tienen reportes de la propagación *in vitro* de *Morus sp.* En 1992 Jain y Datta reportaron organogénesis y regeneración de *Morus bombycis* Koidz cultivar –Schimanochi-, a través del cultivo de callos obtenidos de yemas axilares. utilizaron concentraciones de BA en un medio de cultivo que contenía 2,4-D, ANA y BA, resultando callos con una coloración verde, de textura friable y nodulares que fueron subcultivados en un medio suplementado con BA que originaron brotes y yemas adventicias en 3-4 semanas.

En 1999, Thomas *et al.*, obtuvieron plantas haploides de *Morus alba* L. en el cultivar K-2 mediante la ginogénesis, cultivando ovarios sin polinizar, primero obtuvo el desarrollo *in vitro* de inflorescencias en un medio MS adicionado con BAP y 2,4-D, después de tres semanas los ovarios fueron transferidos a un medio MS complementado con 2,4-D, glicina y prolina. De 20 plantas examinadas, 12 mostraron un número haploide de cromosomas ( $2n=X=14$ ).

Bhau y Walhlu (2001) propagaron morera a partir de callo, evaluando dos variedades (Chinese White y Kokuso-27) utilizando como explantes segmentos de hoja, segmentos internodales y pecíolos, con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, obtuvieron mejor formación de callos con 2,4-D y BA, observaron que la combinación de AIB y ANA.

Anís *et al.* (2003) reportan la propagación en masa de morera (*Morus alba*) utilizando yemas nodales, en un medio de cultivo MS (Murashige y Skoog) adicionado con BAP y Kn para favorecer la brotación y diferenciación de los explantes, otro medio fue utilizando el MS adicionado con BAP, asparagina y glutamina para optimizar la regeneración de brotes. Otro medio de cultivo MS suplementado con ANA propició el enraizamiento de los explantes.

Espinosa *et al.* (2012) evaluaron la formación de callos a partir de diferentes explantes de *Morus alba* L., mencionan que la callogénesis ocurrió en los medios de cultivo con 2,4-D, las mejores concentraciones fueron de 1,0 y 2,0 mg.L<sup>-1</sup> donde se obtuvieron los mejores resultados y los tallos mostraron el mejor explante en la producción de callos de mayor tamaño.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Fase 1: Obtención *in vitro* de callos de morera**

#### **4.1.1 Ubicación del experimento**

La presente investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, en el Departamento de Fitotecnia en la Universidad Autónoma Chapingo, ubicado en el km 38.5 de la carretera México-Texcoco.

#### **4.1.2 Material vegetal**

Se utilizaron plantas de dos variedades de *Morus sp.*: SLP5 y SLP3 con un año de edad, provenientes de la Universidad Politécnica de Francisco I. Madero, Tepatepec, Hidalgo.

#### **4.1.3 Acondicionamiento del material vegetal**

Este proceso se llevó a cabo en el invernadero de Horticultura ubicado en las instalaciones de la Universidad Autónoma Chapingo; las plantas se establecieron en macetas de polietileno y sustrato de tezontle. Se realizaron dos riegos diarios adicionados con un fertilizante químico (Bayfolan ®), además de la aplicación semanal de un fungicida sistémico (Aliette ®) para evitar la contaminación al establecimiento *in vitro*.

#### **4.1.4 Bioensayo para la obtención de callos *in vitro* de morera**

Se colocaron fragmentos foliares de las plantas donadoras que se sometieron a un estricto proceso de desinfección: las hojas (explantes) se colocaron en una solución detergente y Tween 80®, posteriormente se colocaron en una solución de alcohol al 70 % por tres minutos, a continuación se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 10 %. Después se trasladaron a la campana de flujo laminar, donde se les dio un triple enjuague con agua esterilizada, permaneciendo en el último hasta el momento de ser utilizadas.

Los tratamientos estuvieron constituidos por un medio de cultivo base conteniendo las sales Murashige y Skoog (1962), MS, suplementados con sacarosa 3 %, tiamina  $0.40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , myo-inositol  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , agar ( $7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), se ajustó el pH a  $5.7 \pm 0.1$ , y reguladores de crecimiento con dosis diferentes.

El tratamiento uno fue suplementado con Bencil-adenina (BA) y Kinetina (KIN) ( $1.0\text{-}1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), en el tratamiento dos se usaron los mismos reguladores con dosis de  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  cada uno, el tratamiento tres fue adicionado con ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y Tidiazurón (TDZ) ( $1.0\text{-}1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), el tratamiento cuatro contenía los mismos reguladores con dosis de  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  -  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , los tratamientos cinco y seis fueron adicionados con TDZ y BA con dosis de  $1.0\text{-}1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  y  $3.0\text{-}3.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , respectivamente.

La siembra sucedió en la campana de flujo laminar, una vez desinfectados los explantes, fueron fraccionados con un tamaño de  $1 \text{ cm}^2$  y colocadas en Cajas

Petri, la mitad con el haz en contacto con el medio de cultivo y la otra mitad de explantes con el envés en contacto con el medio de cultivo.

Cada tratamiento contenía 12 repeticiones, 6 fueron colocadas en condiciones de luz y 6 repeticiones en oscuridad, el periodo de evaluación fue durante 6 semanas, los individuos en condiciones de luz correspondientes a los tratamientos 1, 2, 5 y 6 no mostraron proliferación aparente de células, los tratamientos 3 y 4 mostraron poca proliferación de células en la periferia de los explantes hasta la semana 4. De los explantes colocados en condiciones de oscuridad solo los tratamientos 3 y 4 mostraron un crecimiento significativo finalizando la segunda semana después de la siembra *in vitro*.

Los segmentos de hoja que tenían el haz en contacto con el medio de cultivo mostraron proliferación de células en forma de callo, mientras que los que se colocaron con el envés en contacto con el medio no mostraron ningún crecimiento de células, durante el periodo de observación, por ello se decidió establecer el experimento con dosis diferentes de 2,4-D y TDZ colocando todos los segmentos de hoja con el haz en contacto con el medio de cultivo.

## **4.1.5 Experimento**

### **4.1.5.1 Desinfestación de explantes**

Se realizó el proceso de desinfestación comenzando con un lavado de las hojas (explantes) con detergente y surfactante Tween 80 ® durante 20 minutos, luego por tres minutos se colocaron en una solución de alcohol al 70 %, y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio al 10 %. Después se trasladaron a la campana de flujo laminar, donde se les dio un triple enjuague con agua esterilizada, permaneciendo en el último hasta el momento de ser utilizadas.

### **4.1.5.2 Medio de cultivo**

Se preparó un medio de cultivo utilizando como base las sales MS (1962) suplementado con sacarosa 3 %, tiamina  $0.40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , myo-inositol  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , agar ( $7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), se ajustó el pH a  $5.7 \pm 0.1$  en cuatro tratamientos que se describen en el cuadro 3, cada uno contó con 5 repeticiones de cada zona de la hoja (apical, media y basal), es decir, cada tratamiento contó con 15 repeticiones, en ambas variedades SLP5 y SLP3 de *Morus alba*.

**Cuadro 3. Tratamientos experimentales en las variedades SLP5 y SLP3 de morera**

Tratamiento	Reguladores* (mg·l <sup>-1</sup> )	
	2,4-D	TDZ
1	1.0	3.0
2	3.0	1.0
3	1.0	1.0
4	3.0	3.0

\* Reguladores de crecimiento: 2,4-D. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; TDZ. Tidiázurón

Una vez preparado el medio de cultivo con el tratamiento asignado, se colocaron 20 ml en frascos tipo gerber, se sellaron con una tapa de polietileno, y se procedió a esterilizarlos en un autoclave a 121 °C, 1.5 Kg cm<sup>3</sup>/s por 40 minutos, se dejaron enfriar para ser usados en la siembra *in vitro*.

#### **4.1.5.3 Siembra *in vitro* de los explantes en el experimento**

Este proceso se realizó en una cámara de flujo laminar, utilizando pinzas de disección, frascos “tipo gerber”, mechero, agua destilada y esterilizada, atomizador con alcohol al 96 %, cubre boca, cofia y bata. Después de esterilizar el medio de cultivo y preparar los explantes se procedió a cortarlos y colocarlos en el frasco correspondiente para situarlos en una cámara de oscuridad.

#### 4.1.5.4 Diseño experimental

El diseño experimental utilizado para el cultivo *in vitro* de callos de morera fue completamente al azar, se evaluaron cuatro tratamientos con 15 repeticiones en cada variedad. Con base en su modelo se realizó un análisis estadístico para las variables de masa y volumen, a las cuales se aplicó la prueba de Tukey con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.0. El modelo estadístico utilizado se describe a continuación:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$ : Respuesta en la  $j$ -ésima unidad experimental, con el tratamiento  $i$ -ésimo

$\mu$ : Media general

$T_i$ : Efecto del tratamiento  $i$ -ésimo

$E_{ij}$ : Error experimental en la  $j$ -ésima repetición del  $i$ -ésimo tratamiento.

Se aplicó la prueba de Tukey al 5 % de probabilidad de cometer un error tipo I.

La hipótesis a probar fue:

$$H_0: \mu_{T1} = \mu_{T2} = \mu_{T3} = \mu_{T4}$$

Hipótesis alternativa: al menos los resultados de un tratamiento difieren del resto.

#### **4.1.5.5 Variables y toma de datos**

Para evaluar la obtención de los callos se midieron variables cuantitativas de peso y volumen; y como variables cualitativas la textura (friable y compacta) y coloración, cada 14 días en un periodo de dos meses desde el momento de la siembra *in vitro*, en cada uno de los tratamientos de las variedades utilizadas de morera SLP5 y SLP3.

#### **4.2 Fase 2. Alimentación de larvas *Bombyx mori* con callos de morera**

Se utilizaron larvas de *Bombyx mori* procedentes de la producción en las instalaciones de la Universidad Politécnica Francisco I. Madero; Las larvas se alimentaron con hojas de morera adicionando su dieta con los callos obtenidos *in vitro*. El periodo de alimentación comprendió 35 días, el diseño experimental consistió de ocho tratamientos con 5 repeticiones.

Los tratamientos que se probaron fueron:

T1: Callo SLP5A

T2: Callo SLP5B

T3: Callo SLP5C

T4: Callo SLP5D

T5: Callo SLP3A

T6: Callo SLP3B

T7: Callo SLP3C

T8: Callo SLP3D

### 4.2.1 Diseño experimental

El diseño utilizado fue completamente al azar.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$ : Respuesta en la j-ésima unidad experimental, con el tratamiento i-ésimo

$\mu$ : Media general

$T_i$ : Efecto del tratamiento i-ésimo

$E_{ij}$ : Error experimental en la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento.

Se aplicó la prueba de Tukey al 5 % de probabilidad de cometer un error tipo I.

La hipótesis a probar fue:

$$H_0: \mu_{T1} = \mu_{T2} = \mu_{T3} = \dots = \mu_{T8}$$

Hipótesis alternativa: al menos los resultados de un tratamiento difieren del resto.

#### 4.2.2 Evaluación de Variables

A partir de su eclosión las larvas fueron colocadas en cajas Petri y posteriormente en recipientes acordes a su tamaño. Se mantuvieron a temperatura ambiente. Se realizó una prueba de aceptación de los callos obtenidos *in vitro* como fuente de alimento en las larvas (Figura 7) sin tomar en cuenta la edad de éstas, haciendo mención que solo habían sido alimentadas con material vegetal fresco.

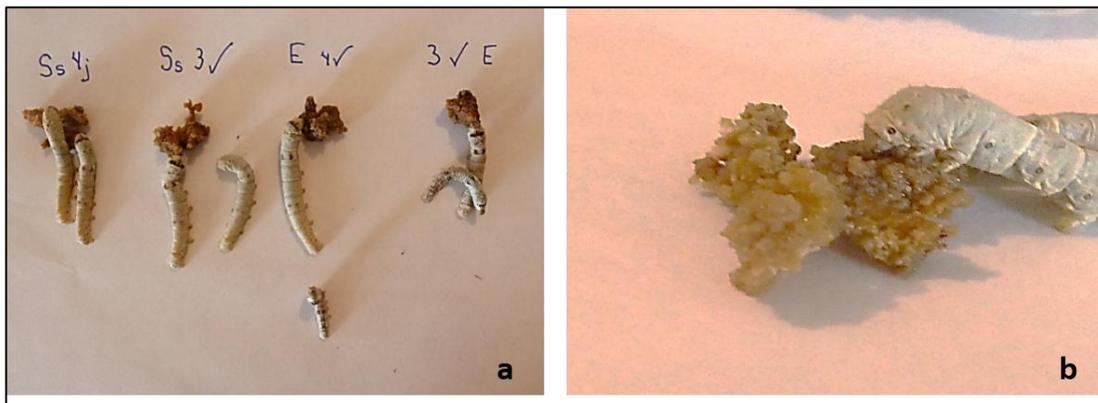


Figura 7. a y b) Prueba de aceptación de los callos obtenidos *in vitro* de *morera* en larvas *Bombyx mori*.

Se proporcionó la dieta normal (hojas de morera) adicionada con los callos en los contenedores de las larvas dos veces al día (9:00 am y 19:00) durante 5 semanas. El incremento en peso y longitud de las larvas se evaluó cada semana suspendiéndolo en la quinta semana. Se midió el porcentaje de sobrevivencia al final del experimento.

Los resultados se procesaron con el paquete estadístico SAS (Statiscal Analysis System) versión 9.0.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Fase 1. Obtención *in vitro* de callos en morera

Una vez establecidos los segmentos de hojas (explantes) en el medio de cultivo correspondiente para obtener callo, se presentó un 11% de contaminación por un complejo de bacterias y hongos (Figura 8), sin embargo se aplicaron medidas sanitarias que permitieron erradicar este aspecto, que se mencionan adelante, garantizando el desarrollo y crecimiento de los callos obtenidos de manera *in vitro* en un 80 %.

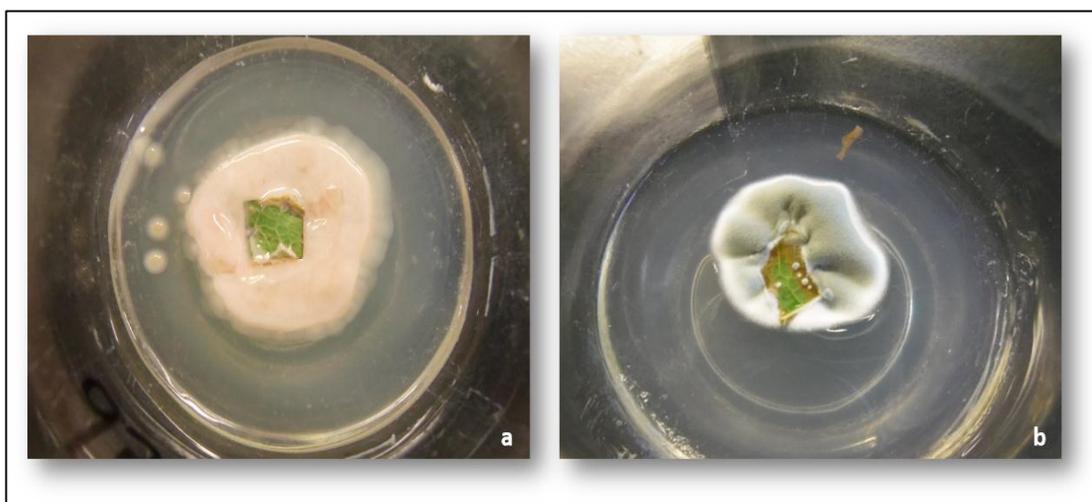


Figura 8. Contaminación *in vitro* por: a) bacterias y b) hongos.

El proceso de recuperación de explantes contaminados consistió en extraer los explantes contaminados del medio de cultivo en el que se encontraban, como primer paso se llevó a cabo el proceso básico de desinfestación para este fin que consiste en sumergir los explantes en una solución de detergente comercial y tween ® (surfactante); como segundo paso, los explantes fueron

sumergidos en alcohol al 70 % durante tres minutos, posteriormente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 10 % por 15 minutos, potencializando este proceso se adicionó un segundo tratamiento con una solución de hipoclorito de calcio al 4 % por 15 minutos, en seguida fueron expuestos en una solución de Timsem® al 100 % durante 15 minutos, a continuación permanecieron 10 minutos en soluciones de fungicidas y bactericidas al 2 % respectivamente, y por último se enjuagaron con agua oxigenada al 100 % para finalmente ser resembrados en un medio de cultivo nuevo (Figura 9).

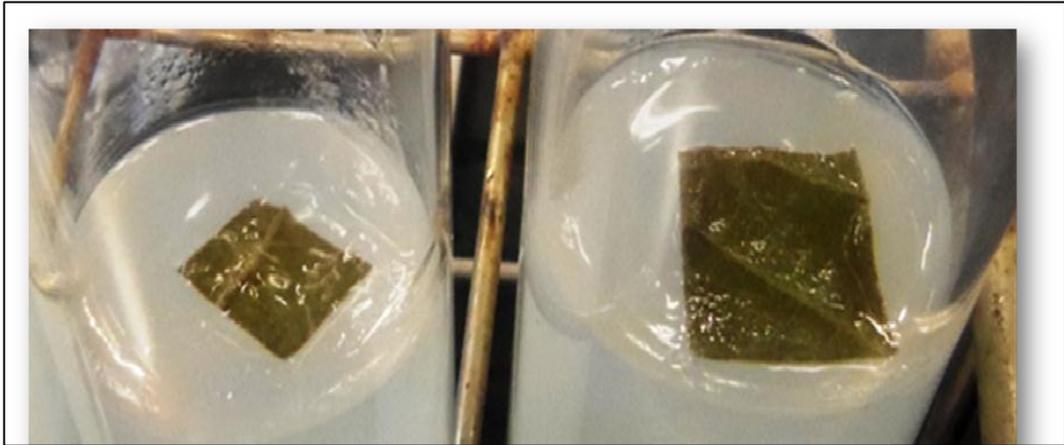


Figura 9. Recuperación *in vitro* de explantes contaminados.

### 5.1.1 Respuesta en la variable masa

La respuesta en el desarrollo de los callos *in vitro* se observó a partir de la segunda semana después de la siembra. En la figura 10 se muestra el comportamiento de los explantes hasta formar los callos.

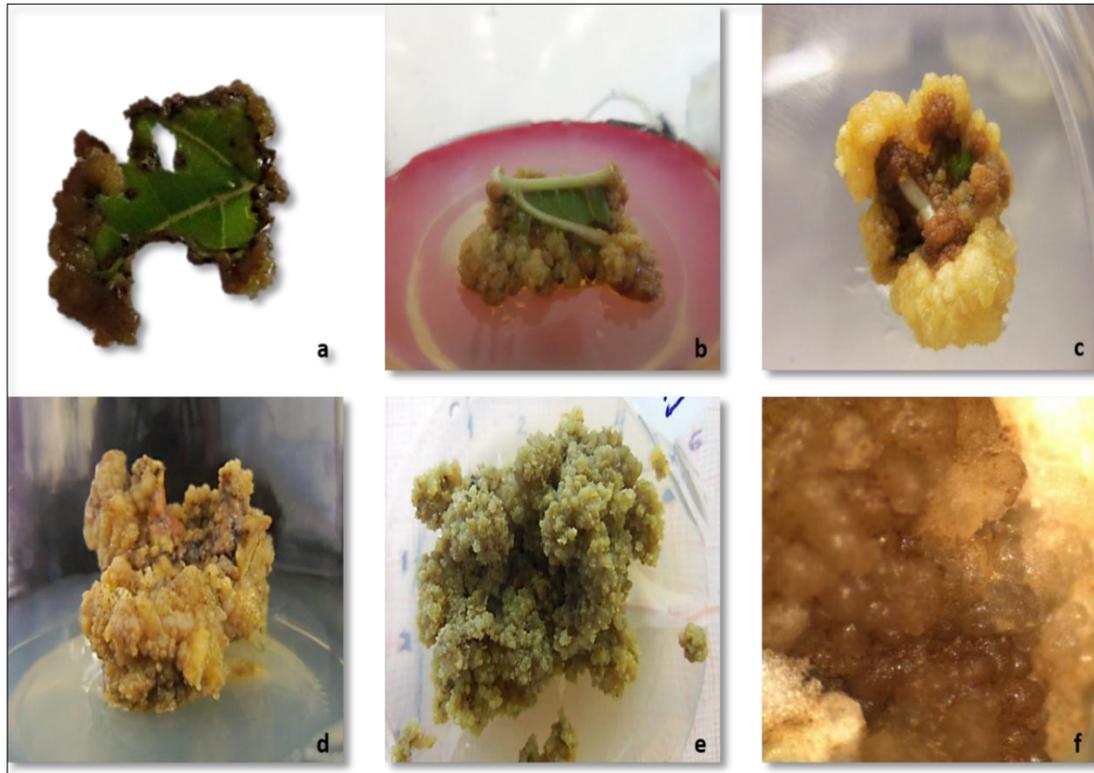


Figura 10. a, b y c) formación paulatina de callos desde la periferia de explantes en la segunda, cuarta y sexta semana después de la siembra respectivamente; d y e) crecimiento máximo de los callos en la octava semana; f) vista microscópica de los callos en la octava semana de su desarrollo.

El peso promedio en la última semana de observación en el desarrollo de los callos obtenidos *in vitro* en la variedad SLP5 en el tratamiento 2 ( $3.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2,4-D y  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  TDZ) y el T4 ( $3.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2,4-D y  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  TDZ) presentaron los más altos valores de masa fresca 2.8818 y 2.8876 g, respectivamente, el

T1 ( $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2, 4-D –  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  TDZ) y el T3 ( $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2, 4-D –  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  TDZ) tuvieron un peso promedio de 2.1645 y 2.0133 g, respectivamente.

En la variedad SLP3 los tratamientos 2 y 4 también fueron los de mayor peso obteniendo 2.8864 y 2.9681 gramos, respectivamente; mientras que en el T1 el peso promedio fue de 1.9728 g y en el T3 fue de 2.0190 g (Figura 11).

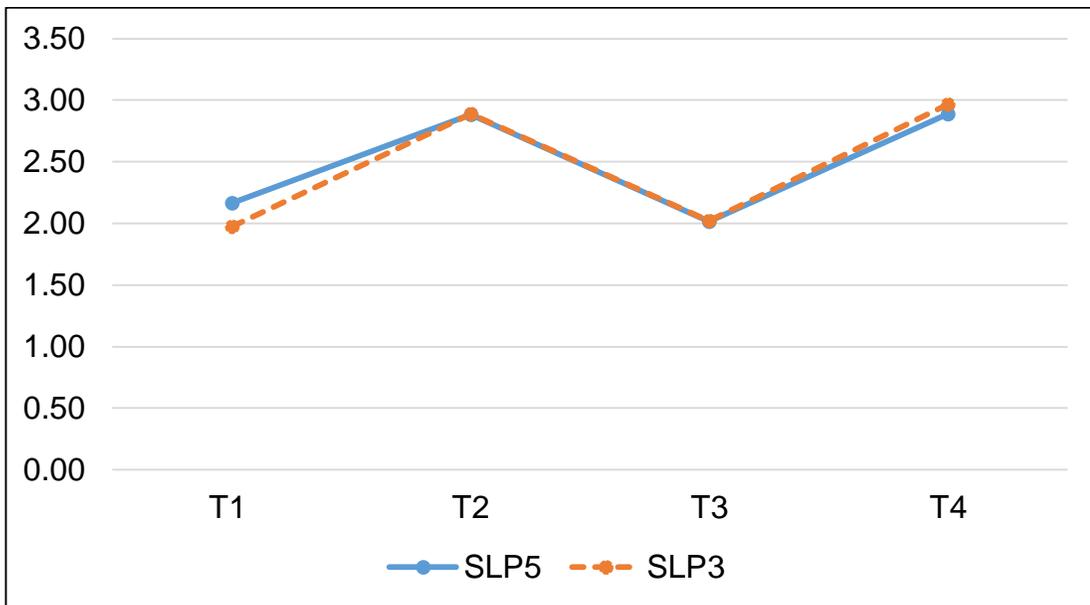


Figura 11. Peso promedio de callos obtenidos *in vitro* de *Morus spp.* de las variedades SLP5 y SLP3, en la semana 8. T1 ( $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2, 4-D –  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  TDZ), T2 ( $3.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2,4-D y  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  TDZ), T3 ( $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2, 4-D –  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  TDZ) y el T4 ( $3.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  2,4-D y  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  TDZ).

Se aplicó la prueba de Tukey con un  $\alpha=0.05$  demostrando estadísticamente que los tratamientos 4 y 2 presentaron las mejores características independientemente de la variedad (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Medias de la variable masa de callos *in vitro* de *Morus spp.* en tratamientos.**

Tratamiento	Masa (g)
4	2.92785a <sup>z</sup>
2	2.88412a
1	2.06866b
3	2.01615b
DMS	0.1097

<sup>z</sup> Valores con la misma letra de factor en cada columna son iguales estadísticamente (Tukey con  $\alpha \leq 0.05$ ). T1 (1.0 mg·l<sup>-1</sup> 2, 4-D – 3.0 mg·l<sup>-1</sup> TDZ), T2 (3.0 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D y 1.0 mg·l<sup>-1</sup> TDZ), T3 (1.0 mg·l<sup>-1</sup> 2, 4-D – 1.0 mg·l<sup>-1</sup> TDZ), T4 (3.0 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D y 3.0 0 mg·l<sup>-1</sup> TDZ). DMS: Diferencia mínima significativa.

En el Cuadro 5 se nota que el peso y volumen de los callos en relación a la zona de las hojas utilizadas como explantes fue estadísticamente igual.

**Cuadro 5. Medias de la variable masa de callos *in vitro* de *Morus spp* en cada zona de hoja.**

Zona	Masa (g)
Basal	2.52087 a <sup>z</sup>
Media	2.46086 a
Apical	2.44085 a
DMS	0.0866

<sup>z</sup> Valores con la misma letra de factor en cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey con  $\alpha \leq 0.05$ . DMS: Diferencia mínima significativa.

Al comparar el peso promedio de los callos en las variedades de morera utilizadas se observaron diferencias estadísticas significativas, denotando que la variedad SLP5 presentó las mejores características durante todo el tiempo de observación (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Medias de la variable masa de dos variedades de callos *in vitro* de *Morus spp.***

Variedad	Masa (g)
SLP5	2.48679 a <sup>z</sup>
SLP3	2.46160 b
DMS	0.0591

<sup>z</sup> Valores con la misma letra de factor en cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey con  $\alpha \leq 0.05$ . DMS: Diferencia mínima significativa.

### 5.1.2 Respuesta en volumen (cm<sup>3</sup>) de los callos obtenidos *in vitro*

El volumen promedio en la última semana de observación en el desarrollo de los callos obtenidos *in vitro* en la variedad SLP5 en el tratamiento 2 (3.0 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D y 1.0 mg·l<sup>-1</sup> TDZ) y el T4 (3.0 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D y 3.0 0 mg·l<sup>-1</sup> TDZ) tuvieron 3.2800 y 3.6533 cm<sup>3</sup> respectivamente. El T1 (1.0 mg·l<sup>-1</sup> 2, 4-D – 3.0 mg·l<sup>-1</sup> TDZ) y el T3 (1.0 mg·l<sup>-1</sup> 2, 4-D – 1.0 mg·l<sup>-1</sup> TDZ) mostraron un volumen promedio de 2.1333 y 2.2667 cm<sup>3</sup> individualmente. En la variedad SLP3 los tratamientos 2 y 4 también fueron los de mayor volumen ya que alcanzaron 3.1200 y 3.1333

cm<sup>3</sup>, respectivamente; el volumen promedio en el T1 fue de 2.0267 cm<sup>3</sup> y en el T3 fue de 2.2833 cm<sup>3</sup> (Figura 12).

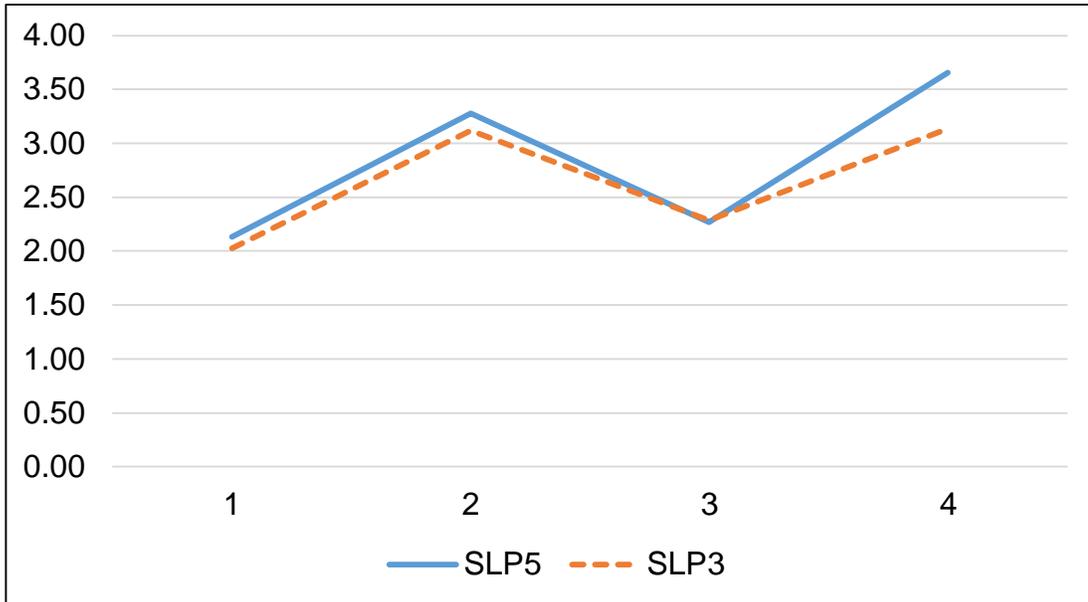


Figura 12. Volumen promedio de callos obtenidos *in vitro* de *Morus spp.* de las variedades SLP5 y SLP3, en la semana 8. T1 (1.0 mg·l<sup>-1</sup> 2, 4-D – 3.0 mg·l<sup>-1</sup> TDZ), T2 (3.0 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D y 1.0 mg·l<sup>-1</sup> TDZ), T3 (1.0 mg·l<sup>-1</sup> 2, 4-D – 1.0 mg·l<sup>-1</sup> TDZ) y el T4 (3.0 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D y 3.0 mg·l<sup>-1</sup> TDZ).

Se aplicó la prueba de Tukey con un  $\alpha=0.05$ , mostrando estadísticamente que los tratamientos 4 y 2 presentaron mayores valores en la variable volumen, independientemente de la variedad (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Medias de la variable volumen de callos *in vitro* de *Morus spp.* en tratamientos.**

Tratamiento	Volumen (cm <sup>3</sup> )
4	3.39333a <sup>z</sup>
2	3.20000a
1	2.27500b
3	2.08000b
DMS	0.2414

<sup>z</sup> Valores con la misma letra de factor en cada columna son iguales estadísticamente (Tukey con  $\alpha \leq 0.05$ ). T1 (1.0 mg·l<sup>-1</sup> 2, 4-D – 3.0 mg·l<sup>-1</sup> TDZ), T2 (3.0 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D y 1.0 mg·l<sup>-1</sup> TDZ), T3 (1.0 mg·l<sup>-1</sup> 2, 4-D – 1.0 mg·l<sup>-1</sup> TDZ), T4 (3.0 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D y 3.0 0 mg·l<sup>-1</sup> TDZ). DMS: Diferencia mínima significativa.

En el cuadro 8 se muestra que el volumen de los callos por zona de la hoja (apical, media y basal) fue estadísticamente igual, es decir, que la zona de la hoja no interfirió en el desarrollo de los callos.

**Cuadro 8. Medias de volumen de callos *in vitro* de *Morus spp* en cada zona de hoja.**

Zona	Volumen (cm <sup>3</sup> )
Basal	2.72000 a
Media	2.69875 a
Apical	2.79250 a
DMS	0.1906

<sup>z</sup> Valores con la misma letra de factor en cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey con  $\alpha \leq 0.05$ . DMS: Diferencia mínima significativa.

En el volumen promedio de los callos en las variedades de morera utilizadas se observó que estadísticamente fueron diferentes, señalando a la variedad SLP5 con los mejores resultados (Cuadro 9).

**Cuadro 9. Medias de la variable masa de dos variedad de callos *in vitro* de *Morus spp.***

Variedad	Volumen (cm <sup>3</sup> )
SLP5	2.83333 a
SLP3	2.64083 b
DMS	0.13

<sup>z</sup> Valores con la misma letra de factor en cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey con  $\alpha \leq 0.05$ . DMS: Diferencia mínima significativa.

Gómez (1998) hace mención que en los tejidos u órganos diferenciados y en presencia de una auxina y/o citoquinina en el medio de cultivo, se logra un proceso de dediferenciación, mediante lo cual las células proliferan continuamente y de forma desorganizada en el explante apareciendo una masa amorfa, lo cual coincide con la presente investigación pues el 2,4-D es una auxina que permitió la dediferenciación celular en el tejido de limbo foliar.

Elías (2008) reporta la formación de callos en *Morus alba*, a partir de la primera semana de la siembra observó cambios morfológicos y abultamientos en los bordes de los diferentes explantes que utilizó, mientras que Vaca y Romero (2009) señalan que el inicio de la formación de callos en morera con diferentes explantes de la variedad acorazonada de morera sucedió en las dos primeras

semanas del cultivo *in vitro*, éstos últimos son similares a los obtenidos en esta investigación, ya que al finalizar la segunda semana después de la siembra se observaron abultamientos en la periferia del explante.

De acuerdo con Pierik (1990), las auxinas (AIB y 2, 4-D,) forman callo. En esta investigación la presencia de 2,4-D fue determinante para la proliferación de células dando lugar a la formación de callos en morera. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Cholo *et. al.* (2011) quienes obtuvieron callos *in vitro* de *Morus spp* utilizando diferentes dosis de 2,4-D.

Bhau y Wakhlu (2001) reportan dosis de 2,4-D y BA ( $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  y  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) exitosa en la propagación de morera a partir de callo usando como explantes segmentos de hoja, segmentos internodales y peciolos, mientras que Sanginés *et al.* (1999) obtuvieron exitosamente callos *in vitro* de *Morus alba* a partir de peciolos, limbos y yemas axilares, con dosis de  $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de BAP y  $0.25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de 2,4-D. Aunque en esta investigación se experimentó con dosis más altas ( $1.0 - 3.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) de esta fitohormona, también se obtuvieron resultados satisfactorios en la obtención de callo, utilizando como explante, segmentos de hojas.

En cultivos *in vitro* de otras especies como en *Coffea arábica*, Santana *et al.*, (1994) también obtuvieron la formación de callos embriogénicos con dosis de  $1-3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de 2,4-D a partir de segmentos de hojas. Martínez *et al.* (2004) mencionan que el uso de 2,4-D ( $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) indujo la obtención de raíces en eucalipto a partir del cultivo *in vitro* de segmentos de hoja, mientras que el TDZ

(0.1 mg·l<sup>-1</sup>) fue suficiente para la inducción de callo, en esta investigación se puede inferir que el TDZ también influyó en la expresión de la proliferación celular.

### **5.1.3 Respuesta en las variables textura y color de los callos obtenidos *in vitro*.**

La coloración fue cambiante conforme la edad de los callos (Cuadro 10), entre más avanzaba la edad la coloración se tornó oscura (Figura 13), lo cual concuerda con Vaca y Romero (2009), quienes obtuvieron callos en el cultivo de la morera de un color amarillo-parduzco en la totalidad de los explantes evaluados y su coloración no dependió de las concentraciones de 6-BAP y de 2,4-D empleadas, mientras que Elías (2008) logró en sus estudios, callos de morera de color marrón amarillenta, lo que atribuyó a la presencia de fenoles.

**Cuadro 10. Color de los callos obtenidos *in vitro* de *morera* en los diferentes tratamientos**

Días	Variedad	T1	T2	T3	T4
14	SLP5	Amarillo *	Amarillo *	Amarillo *	Amarillo *
28	SLP5	Amarillo	Amarillo - crema	Amarillo - crema	Amarillo
42	SLP5	Amarillo – crema	Amarillo - naranja	Amarillo - naranja	Amarillo – naranja
56	SLP5	Naranja- café	Amarillo café	Amarillo- café	Amarillo- naranja
14	SLP3	Amarillo *	Amarillo *	Amarillo *	Amarillo *
28	SLP3	Amarillo	Amarillo - crema	Amarillo - crema	Amarillo
42	SLP3	Amarillo – crema	Amarillo - naranja	Amarillo - naranja	Amarillo – naranja
56	SLP3	Naranja- café	Amarillo café	Amarillo- café	Amarillo- naranja

\* Segmentos verdes de explantes aun visibles.

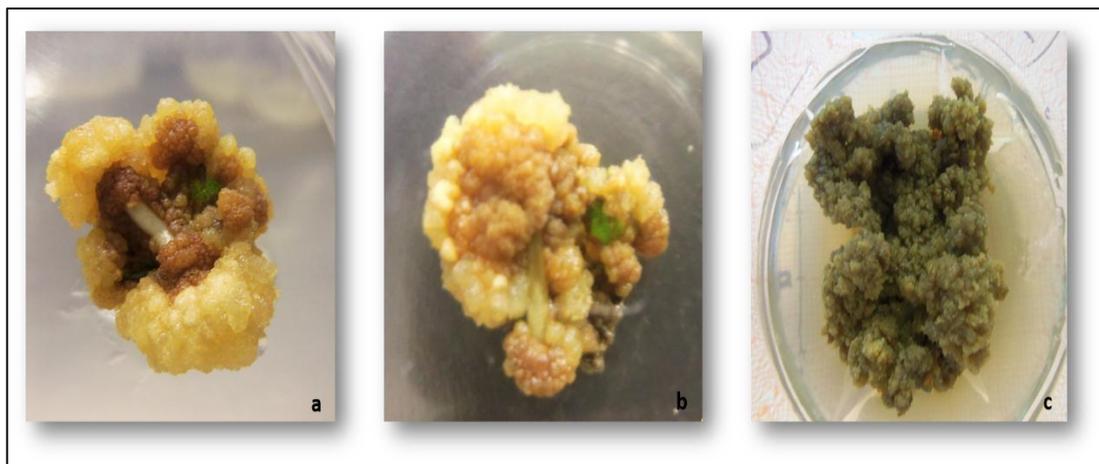


Figura 13. Coloración de callos *in vitro* en: a) cuarta semana de desarrollo, b) séptima semana de desarrollo. c) callo necrosado después de la octava semana.

La textura de los callos obtenidos de esta investigación, en todos los tratamientos fue friable, presentando una consistencia esponjosa y granular, contrariamente a Mesa *et al.* (1993), puesto que mencionan que en todas las combinaciones que utilizaron 2,4-D (1 y 2 mg·l<sup>-1</sup>) con 6-BAP (2 y 4 mg·l<sup>-1</sup>) obtuvieron callos compactos en la especie *Stylosanthes guianensis*.

Jiménez (1998) considera que el abundante crecimiento de los callos puede deberse a que en condiciones de oscuridad no ocurre el efecto degradante que provoca la luz sobre las auxinas, principalmente el 2,4-D y el AIA por un proceso oxidativo, lo cual pudo corroborarse en esta investigación pues en el bioensayo realizado se observó que no hubo crecimiento celular en condiciones de luz.

## 5.2 Fase 2. Alimentación de larvas *Bombyx mori* con callos de morera

Una vez observada la aceptación de los callos se procedió a incluirlos dentro de la dieta ofrecida normalmente (Figura 14).



Figura 14. Dieta de larvas *Bombyx mori* con callos de morera obtenidos de manera *in vitro* en: a y b) la primera etapa larvaria; c y d) la cuarta etapa larvaria.

### 5.2.1. Respuesta en la variable longitud

De acuerdo a los datos tomados de la semana 1 a la semana 5, la prueba de Tukey con un  $\alpha \leq 0.05$  mostró que en la variable longitud, las larvas con la dieta de los Tratamientos T4SLP5D, T8SLP3D, T2SLP5B, T6SLP3B, T3SLP5C, T7SLP3C presentaron los mayores valores, lo que los hace significativamente iguales entre sí, pero diferentes de los T1SLP5A y T5SLP3A (Cuadro 11).

**Cuadro 11. Medias de la variable longitud de larvas *Bombyx mori* en 35 días**

<b>Tratamiento</b>	<b>Longitud (cm)</b>
T4 SLP5D	2.61800 a <sup>z</sup>
T8 SLP3D	2.61782 a
T2 SLP5B	2.52400 a
T6 SLP3B	2.52360 a
T3 SLP5C	2.46800 ab
T7 SLP3C	2.46820 ab
T1 SLP5A	2.34800 b
T5 SLP3A	2.34769 b
DMS	0.1720

<sup>z</sup> Valores con la misma letra de factor en cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey con  $\alpha \leq 0.05$ . DMS: Diferencia mínima significativa

### 5.2.2. Respuesta en la variable peso

La prueba de Tukey con un  $\alpha=0.05$  mostró que en la variable peso, las larvas con la dieta de los Tratamientos T4SLP5D, T8SLP3D, T2SLP5B, T6SLP3B, T3SLP5C, T7SLP3C presentaron los mayores valores, lo que los hace significativamente iguales entre sí, pero diferentes de los T1SLP5A y T5SLP3A (Cuadro 12).

**Cuadro 12. Medias de la variable peso de larvas *Bombyx mori* en 35 días**

<b>Tratamiento</b>	<b>Peso (g)</b>
T4 SLP5D	2.65810 a <sup>z</sup>
T8 SLP3D	2.65768 a
T2 SLP5B	2.60210 a
T6 SLP3B	2.60189 a
T3 SLP5C	2.58810 ab
T7 SLP3C	2.58800 ab
T1 SLP5A	2.46210 b
T5 SLP3A	2.46194 b
DMS	0.1304

<sup>z</sup> Valores con la misma letra de factor en cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey con  $\alpha \leq 0.05$ . DMS: Diferencia mínima significativa

Es importante mencionar que las larvas alcanzaron valores promedio de las variables longitud en la quinta semana de observación como se indica en el Cuadro 13.

**Cuadro 13. Promedios de longitud y peso en larvas *Bombyx mori* con una dieta combinada con callos *in vitro* y follaje fresco de *morera* en la semana 5.**

Tratamiento	Longitud (cm)	Peso (g)
T1 SLP5A	5.44	4.86
T2 SLP5B	5.76	5.06
T3 SLP5C	5.64	5.04
T4 SLP5D	5.92	5.14
T5 SLP3A	5.45	4.90
T6 SLP3B	5.74	5.00
T7 SLP3C	5.60	5.02
T8 SLP3D	5.88	5.11

La sobrevivencia de las larvas fue de 57.14 %. Los gusanos sobrevivientes llegaron a formar capullos de seda y emergió el 100 %, continuaron y concluyeron exitosamente su ciclo de vida (Figura 15).

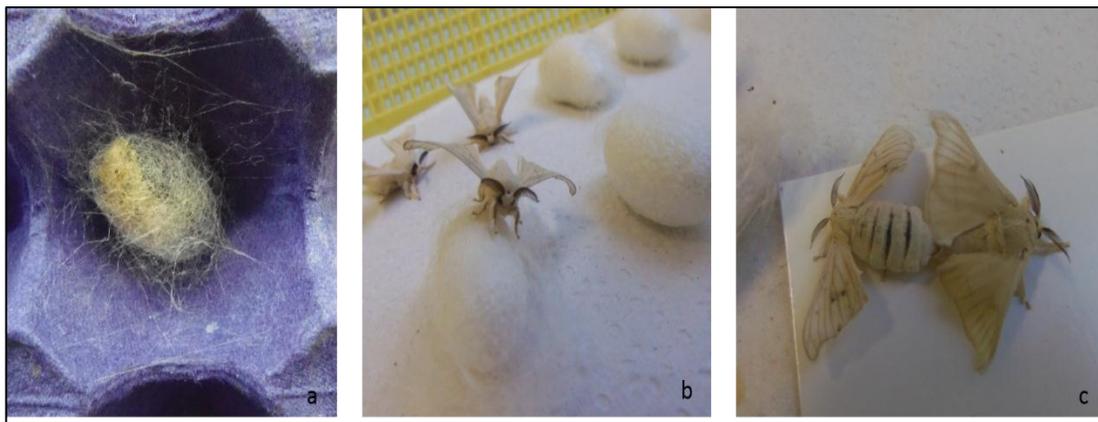


Figura 15. a) Elaboración de capullos de seda; b) Emergencia de mariposas *Bombyx mori*; c) Reproducción de gusanos de seda.

La formación de capullo comenzó hasta el día 46 y transcurrieron 12 15 días para que sucediera la eclosión satisfactoriamente (Figura 16), la etapa larvaria de *Bombyx mori* tiene una duración variable dependiendo en gran medida de las condiciones ambientales, a una temperatura de 20 °C la duración aproximada es de 50 a 55 días (Rodríguez *et al.*, 2013), y se puede acelerar a 15 días aumentando la temperatura hasta 45 °C. En esta investigación se nota que la etapa larvaria tuvo una duración de 45 días, lo cual lleva a considerar que el ciclo biológico fue normal tomando en cuenta las fluctuaciones de temperatura ambiente.

Los capullos obtenidos tuvieron una longitud promedio de 2.54 cm y un diámetro de 1.315 cm.



Figura 16. Capullos obtenidos de los adultos *Bombyx mori* alimentadas con los callos *in vitro* de *Morus sp.* de la variedad: a) SLP5 y b) SLP3.

## 6. CONCLUSIONES

El protocolo para la obtención de callos *in vitro* en esta investigación fue exitoso.

Los callos obtenidos de los tratamientos cuatro y dos (3:3, 3:1 mg·l<sup>-1</sup> de 2,4-D y TDZ, respectivamente) presentaron las mejores características en las variables evaluadas.

En general todos los callos de *Morus spp.* que se obtuvieron *in vitro* fueron factibles para alimentar a los gusanos de seda, por lo que es posible considerarlos como parte de su dieta alimenticia.

Se obtuvieron capullos de seda con características aceptables para la obtención de hilos artesanales.

## 7. RECOMENDACIONES

Continuar experimentando con dosis diferentes dosis de reguladores de crecimiento distintos a los utilizados en esta investigación para la obtención de callos *in vitro*.

Evaluar dietas constituidas exclusivamente de callos *in vitro* de *morera* en larvas *Bombyx mori*.

Analizar detalladamente los posibles cambios biológicos que pudieran presentarse en las larvas *Bombyx mori* alimentadas con una dieta a partir de callos *in vitro* de *morera* utilizando reguladores de crecimiento.

Liofilizar callos de *morera* obtenidos de manera *in vitro* y realizar pruebas alimenticias de éste producto en larvas *Bombyx mori*.

Esta investigación es una pauta para la obtención de callos *in vitro* de otras especies vegetales *Agave* u otros, como alternativa alimenticia de larvas cuya desarrollo depende de estas especies como el guano de maguey (*Acentrocneme hesperiaris*), el chinicuil (*Hypopta agavis*), entre otros.

## 8. LITERATURA CITADA

ACUÑA, C. 2004. La biotecnología forestal. INTA-CONICET. Consejo Argentino para la formación y el desarrollo de la Biotecnología. (Original no consultado, citado por: JÁCOME J., PÁEZ T., ROMERO, P., REYES C. 2002. Establecimiento, inducción y evaluación a callogénesis in vitro de meristemos apicales de árboles jóvenes de Romerillo (*Podocarpus oleifolius*) como futura estrategia de conservación de la especie en el Distrito de Quito. Laboratorio de Micropropagación Vegetal EPMOP-Q. Sangolquí—Ecuador. pp 9).

ALONSO, G. M. 2002. Biotecnología aplicada a la mejora de *Pelargonium*. Tesis Dr. Cien. Universidad Complutense de Madrid. Madrid España. Pp 136.

ANÍS, M.; FAISAL, M.; SINGH S. K. 2003. Micropropagation of Mulberry (*Morus alba* L.) through In vitro culture of shoot tip and nodal explants. *Plant Tissue Culture*. 13 (1): 47-51.

BENAVIDES, J; LACHAUX, M; FUENTES, M. 1993. Efecto de la aplicación de estiércol de cabra en el suelo sobre la calidad y producción de biomasa de morera (*Morus* sp.) En: Árboles y arbustos forrajeros en América Central. Turrialba, C.R. CATIE 2(236): 495-514

BENAVIDES, J; LACHAUX, M; FUENTES, M. 1994. Utilización de la Morera en sistemas de producción animal. (Disponible en <http://www.fao.org/livestock/agap/frg/AGROFOR1/Bnvdes12.htm>. Consultado el 13 de agosto de 2013).

BHAU, B.S.; WAKHLU, A.K. 2001. Effect of explant type and growth regulators on organogenesis in *Morus alba*. *Plant cell tissue and Organ Culture*. 66: 25-29.

BHAU, B.S.; WAKHLU, A.K. 2003. Rapid micropropagation of five cultivars of mulberry. *Biología Plantarum* 46 (3): 249-355.

CEPEDA, J. 1991. El árbol de oro. Los mil usos de la morera. *Medio Ambiente (Perú)* 47: 28-29.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Roca, W.M y Mroginaki, L. A., (eds). Cali, Colombia. 970 p.

CHOLO, M. L. F.; DELGADO R. H. B. 2011. Formación de callos en el cultivo de la morera (*Morus alba* L.). Tesis. Ministerio de educación superior, Universidad de Granma. Cuba. 45 p.

CRUZ, F.C. 1993. Cultivo de la morera. Instituto Nacional de Investigación Agraria. Manual 14-93. Lima, Perú. 82 p.

ELÍAS, Y. 2008. Establecimiento y formación de callos de *Morus alba* L. en condiciones in vitro. En: Trabajo de Diploma. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Universidad de Granma. Bayamo Cuba. (Original no consultado, citado por: CHOLO, M. L. F.; DELGADO R. H. B. 2011. Formación de callos en el cultivo de la morera (*Morus alba* L.). Tesis. Ministerio de educación superior, Universidad de Granma. Cuba. 45 p).

FREIRE, M. 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Instituto de Biotecnología de las plantas Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Cuba. *Biotecnología Vegetal* 3(4): 195-209.

HURTADO, M. D., MERINO, E. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales México, D.F Ed. Trillas. (Original no consultado, resumen en: *Agraria* 10(12).

JAIN, A. K.; DANDIN, S. B.; SENGUPTA, K. 1990. In vitro propagation through axillary bud multiplication in different mulberry genotypes. *Plant Cell Reports* 8:737-740.

JAIN, A. K.; DATTA, R.K. 1992. Shoot organogénesis and plant regeneration in mulberry (*Morus bombycis* Koidz): Factors influencing morphogenetic potential callus cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 29: 43-50.

JIMÉNEZ, E. 1998. Generalidades del cultivo in vitro. En: Pérez JN. (eds). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Bio- tecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba .Pp 45-46.

LEDEZMA, H. A. 1994. Micropropagación en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Tesis. Universidad Autónoma Chapingo. 102 p.

MACHII, H. 1992. Organogenesis from immature leaf cultures in mulberry (*Morus alba* L.) *J. Seric. Sci. Jap.* 61:512-519.

MACHII, H.; KOYAMA, A.; YAMANOUCHI, H. 2000. FAO Electronic Conference: Mulberry for Animal Production. Disponible en: <http://www.fao.org/livestock/agap//mulberry>. Consultado el 28 de Junio de 2013.

- MARTÍNEZ, R.R.; AZIPIROZ, R. H. S.; RODRÍGUEZ, O. J. L.; CETINA, A. V. M.; GUTIERREZ, E. M. A. 2004. Embriogénesis somática de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden y *Eucalyptus urophylla*. S. T. Blake. Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente. 10 (002)
- MESA, A.R.; LAJONCHERE, G.; PRIETO, M. Y TORAL, ODALYS. 1993. Organogénesis en *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT 184. Pastos y Forrajes. 16:207.
- MILERA, M.; MARTÍN G.; OJEDA, F. 2003. Potencial del forraje de morera para la alimentación del ganado. Pastos y Forraje. Indio Hatuey. 29 (2) Pp 1-27.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. *Physiol. Plant.* 15:473-497. (Original no consultado, citado por: Conger, B. V., Novak, F. J., Afza R., Erdelsky, K. Somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *Zea mays*. 1987, *Plant Cell Reports.* 6(5): 345-347).
- OLMOS 2004. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Parte V. En *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal*. Editores. Dra. Viviana Echenique, Dra. Clara Rubinstein, Ing. Luis Mroginsky. Consejo Argentino para la información y el Desarrollo de la Biotechnología. INTA. Pp 163-172.

PADILLA, Á.F.; CUESTA, L.A.E. 2003. Zoología aplicada. Madrid España, Ediciones Díaz de Santos. 488 p.

PIERIK, R.L.M. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ediciones Mundi Prensa. Madrid España. Pp 45-86.

RADICE, S. 2004. Morfogénesis in vitro. Parte II Herramientas Básicas de la Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. En: Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L. (eds). Biotecnología y Mejora Vegetal. (Ed): INTA, Buenos Aires, Argentina. Pp. 27-33.

RODRÍGUEZ, O. A.; VARGAS, M. J.; VENTURA, M. A.; MARTÍNEZ, M. A.;  
RODRÍGUEZ, M. J.; MUHAMMAD, E.; LARA, V. F.M. 2012. Manual de sericultura en Hidalgo, Principios básicos. Primera edición. México, D.F. 102 p.

SALAZAR, E.; TORREALBA, D.; CASTRO, L., TORREALBA, M. 2005. La caseína hidrolizada inhibe el desarrollo de callos provenientes de anteras de cacao cultivadas in vitro. Agronomía Tropical. 55 (4): 497-5005.

SÁNCHEZ, M. D. 1999. Mulberry: an exceptional forage available almost world- wide. World Animal Review 93(2):36-46.

SÁNCHEZ, M. D. 2002. "World distribution and utilization of mulberry and its potential for animal feeding". FAO, Rome. (Original no consultado, resumen en: *Animal Production and Health Paper* 147:1-9).

SÁNCHEZ, M. D. 2006. Morera: un forraje excepcional disponible mundialmente. En línea [www.fao.org/ag/aga/agap/frg/fris/espanol/document/agrof99/sanchezm.htm](http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/fris/espanol/document/agrof99/sanchezm.htm). Consultado el 10 de Septiembre de 2013.

SANGINÉS, G.J. 1999 Avances en los programas de investigación en morera (*Morus alba*. L) en Yucatán. I Taller internacional de morera «La morera (*Morus alba* L), oportunidades y posibilidades de uso para la alimentación animal». EEPF «Indio Hatuey», Matanzas, Cuba. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/AGa/AGAP/FRG/AFRIS/espanol/Document/Morera/MORERA20.HTM>. Consultado el 18 de Junio de 2013.

SANTANA, N., MARTINEZ, O., GONZALEZ, M.C., 1988. Embriogénesis somática en el cultivo del café (*Coffea arábica*) Parte D. Cultivos Tropicales 10 (2):36-43.

SOO-HO, L.; YOUNG-TAEK, K.; SANG-POONG, L.; IN-JUN, R.; JUNG-SUNG, L.; BYUNG-HO, L. 1990. Sericulture training manual. FAO. Agricultural Services Bulletin 80:117.

VACA, P.; ROMERO, E. 2009. Propagación de la morera (*Morus alba* L.) mediante el cultivo de tejidos var. Acorazonada. Trabajo de diploma. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Universidad de Granma. Bayamo Cuba. (Original no consultado, citado por CHOLO, M. L. F.; DELGADO R. H. B. 2011. Formación de callos en el cultivo de la morera (*Morus alba* L.). Tesis. Ministerio de educación superior, Universidad de Granma. Cuba. 45 p.)