

Artículo científico

Influencia del tamaño de las plantas *in vitro* y tipo de sustrato en la aclimatación de *Morus alba* L.Influence of *in vitro* plant size and substrate type on the acclimatization of *Morus alba* L.

Ángel Espinosa-Reyes, Juan José Silva-Pupo, Marisel Bahi-Arevich y Dariannis Romero-Cabrera

Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma

Carretera a Manzanillo km 17½, CP 85100, Bayamo, Granma, Cuba

E-mail: aespinosar@udg.co.cu

<https://orcid.org/0000-0002-9918-641X>

Resumen

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la influencia del tamaño y el tipo de sustrato en la aclimatación de plantas *in vitro* de *Morus alba* L. Para ello se realizaron tres experimentos: en el primero se evaluaron vitroplantas agrupadas según sus tamaños, que constituyeron los tratamientos (T1: 1,5-2,5 cm; T2: 2,6-3,5 cm y T3: mayores de 3,5 cm); en el segundo se seleccionaron plantas con una longitud entre 2,5-3,0 cm y se evaluaron tres formulaciones de mezclas de sustratos: T1: suelo (70 %)-estiércol vacuno (20 %)-zeolita (10 %), T2: suelo (45 %)-estiércol vacuno (45 %)-zeolita (10 %), T3: suelo (90 %)-zeolita (10 %); y en el tercero se evaluó el tipo de sustrato en el crecimiento de las vitroplantas en condiciones de vivero, con los mismos tratamientos. Se realizó un análisis de varianza simple, y se aplicó la prueba de comparación múltiple de rango de Tukey para $p \leq 0,05$. Se utilizó el paquete estadístico Infostat (2017) sobre Windows®. Los incrementos en la longitud de los brotes y la supervivencia (93,6 %) fueron significativamente superiores cuando se utilizaron vitroplantas de 1,5 a 2,5 cm de longitud. Con el empleo de las mezclas de sustrato T1 y T2 se obtuvo una supervivencia mayor de 80 %; al igual que mayor longitud, número de hojas y tamaño de las hojas en las vitroplantas en la fase inicial de la aclimatación y en las condiciones de vivero. Se concluye que con el empleo de vitroplantas de tamaño entre 1,5 y 2,5 cm y los sustratos de los tratamientos T1 y T2 durante la aclimatación, se logró una supervivencia alta y mayor crecimiento y desarrollo de las plantas de *M. alba*.

Palabras clave: crecimiento, cultivo de tejidos, supervivencia, vitroplantas

Abstract

The objective of this study was to evaluate the influence of size and substrate type on the acclimatization of *in vitro* *Morus alba* L. plants. For such purpose, three trials were conducted: in the first one *in vitro* plants were evaluated grouped according to their sizes, which constituted the treatments (T1: 1,5-2,5 cm; T2: 2,6-3,5 cm and T3: higher than 3,5 cm); in the second one, plants with a length between 2,5 and 3,0 cm were selected and three formulations of substrate mixtures were evaluated: T1: soil (70 %)-cattle manure (20 %)-zeolite (10 %), T2: soil (45 %)-cattle manure (45 %)-zeolite (10 %), T3: soil (90 %)-zeolite (10 %); and in the third trial the substrate type was evaluated on the *in vitro* plant growth under nursery conditions, with the same treatments. A simple variance analysis was carried out, and Tukey's multiple range comparison test was applied for $p \leq 0,05$. The statistical package Infostat (2017) on Windows® was used. The increases in sprout length and survival (93,6 %) were significantly higher when *in vitro* plants from 1,5 to 2,5 cm long were used. Using the substrate mixtures T1 and T2 a survival higher than 80 % was obtained; just like higher length, number of leaves and leaf size in the *in vitro* plants in the initial stage of acclimatization and under nursery conditions. It is concluded that with the use of *in vitro* plants of size between 1,5 and 2,5 cm and the substrates of treatments T1 and T2 during acclimatization, high survival and higher growth and development of the *M. alba* plants were achieved.

Keywords: growth, tissue culture, survival, *in vitro* plants

Introducción

La morera (*Morus alba* L.) se introdujo en Cuba con fines forrajeros para la alimentación animal, y se ha demostrado que posee excelentes cualidades nutricionales para la alimentación de diferentes especies de animales (Noda-Leyva y Martín-Martín, 2017). Esta planta tiene una gran capacidad adaptativa a diferentes condiciones edafoclimáticas, puede

producir entre 10 y 12 t de materia seca por hectárea al año, contiene de 20 a 25 % de proteína bruta, y la digestibilidad de la materia seca es superior a 80 % (Martín *et al.*, 2014). Además, es reconocida por su valor comercial en la industria cosmética y medicinal, y sus propiedades fitoquímicas antioxidantes e hipoglucemiantes han sido ampliamente utilizadas en la producción de medicamentos (Huh *et al.*, 2017).

La propagación de la morera se realiza generalmente por estaca; sin embargo, en dependencia del cultivar existen ciertos aspectos –como la baja tasa de supervivencia y de multiplicación, así como la dificultad de enraizamiento–que limitan la propagación de esta especie vegetal con fines productivos (Castro-Ramírez, 2010).

La propagación *in vitro* de especies vegetales ha surgido como una alternativa valiosa para la propagación de especies de interés económico y ornamental, debido a que posibilita la producción de grandes cantidades de plantas en un período de tiempo relativamente corto; es una excelente herramienta para la preservación y recuperación de especies que han disminuido significativamente sus poblaciones y para la mejora genética.

Los programas de mejora genética de la morera están orientados al incremento de los rendimientos del follaje. Sin embargo, debido a la alta heterocigocidad y a los largos períodos para la regeneración de las plantas, las técnicas convencionales de mejoramiento genético están limitadas; por ello ha sido necesario complementarlas con modernas técnicas biotecnológicas, tales como el cultivo de tejidos, técnicas moleculares de recombinación del ADN y marcadores moleculares (Vijavan *et al.*, 2014).

El éxito de las técnicas de cultivo de tejidos depende esencialmente de tener bien establecido un protocolo que incluya las diferentes etapas del proceso, como son la propagación, el enraizamiento y la aclimatación de las plantas (Resende *et al.*, 2015).

En Cuba se han realizado diversos trabajos de investigación orientados a establecer un protocolo eficiente de propagación *in vitro* de la morera, entre los que se destacan los de Salas *et al.* (2005) y Salas *et al.* (2011), encaminados a la propagación de esta planta mediante organogénesis en medio de cultivo semisólido y en sistemas de inmersión temporal. Asimismo, es de señalar que aunque los estudios relacionados con la aclimatación de plantas de morera provenientes de cultivo de tejidos son escasos, Salas *et al.* (2005) obtuvieron valores de supervivencia entre 60 y 70 % cuando evaluaron el efecto del sustrato, además de los caracteres morfológicos de las plantas en condiciones de campo.

Las plantas que provienen del cultivo de tejidos, generalmente, requieren de tratamientos para prevenir su muerte después de transferidas a condiciones *ex vitro*, ya que las producidas *in vitro* son incapaces de resistir los cambios de ambiente a los que se enfrentan, debido a que se han desarrollado

en un ambiente aséptico, con variaciones mínimas de temperatura, alta humedad y disponibilidad de nutrientes y baja concentración de dióxido de carbono. Por ello, la transferencia debe realizarse de forma gradual; durante esta etapa se produce un retorno gradual al funcionamiento autotrófico de las vitroplantas, así como la recuperación de las características morfológicas y fisiológicas normales (Silva *et al.*, 2017).

Tomando en consideración todo lo anteriormente mencionado se realizó esta investigación que tuvo como objetivo evaluar la influencia del tamaño y el tipo de sustrato en la aclimatación de plantas *in vitro* de *M. alba*.

Materiales y Métodos

El estudio se realizó en el área de aclimatación del Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, en la Universidad de Granma (UDG) –Cuba–, en el periodo de octubre 2017 a junio de 2018.

Se hicieron tres experimentos; el material vegetal utilizado en el primero y en el segundo consistió en vitroplantas de *M. alba* de la variedad acorazonada, enraizadas durante 60 días en un medio de cultivo constituido por las sales Murashige y Skoog (1962), suplementadas con ácido indolbutírico 1 mg.L⁻¹, tiamina 1 mg.L⁻¹, mioinositol 100 mg.L⁻¹, sacarosa 20 g. L⁻¹, y solidificado con agar 6 g.L⁻¹. El pH fue ajustado a 5,7. En el tercer experimento se utilizaron plantas de morera aclimatizadas durante 30 días en condiciones *ex vitro*, con una longitud de 7,03 cm y seis hojas, como promedio.

Todos los experimentos se desarrollaron en la casa de adaptación del Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, bajo una malla serán de color negro, para regular la iluminación.

En el primer y el segundo experimento las plantas se extrajeron de los frascos de cultivo. Las raíces se lavaron de forma cuidadosa con abundante agua, para eliminar los restos del medio de cultivo; y se colocaron en un recipiente con agua corriente, para evitar su deshidratación, durante un periodo de 13 a 14 horas antes de ser trasplantadas a las condiciones *ex vitro*.

En el momento de plantar se cubrió totalmente el sistema radical de las vitroplantas con el sustrato, presionando ligeramente para garantizar que estas se fijaran. Se utilizaron bandejas de polieturano de 70 alveolos, con una capacidad de cada alveolo de 120 cm³ de sustrato; en cada uno se plantó una

vitroplanta, y todas fueron cubiertas con pomos de cristal transparente durante siete días, con el fin de mantener una humedad relativa alta y con ello disminuir la pérdida de agua. Después de transcurrido este tiempo se eliminó la cubierta.

En el tercer experimento se utilizaron bolsas de polietileno negro, llenas hasta las tres cuartas partes con la mezcla del sustrato a evaluar. El riego en todos los experimentos se realizó diariamente con una regadera manual, hasta que el sustrato estuvo saturado.

Para todos los experimentos se utilizó un diseño completamente aleatorizado con tres réplicas. En cada repetición se plantaron 15 vitroplantas, para un total de 45 por tratamiento.

En el experimento 1 se estudió la influencia del tamaño en la aclimatación de plantas *in vitro* de morera. Estas fueron clasificadas de acuerdo con su longitud en tres grupos y ello permitió conformar los tratamientos siguientes: T1: pequeñas (1,5-2,5 cm), T2: medianas (2,5- 3,5 cm), T3: grandes (> 3,5 cm). Se utilizó como sustrato una mezcla de suelo (70 %)-estiércol vacuno (20 %)-zeolita (10 %).

Por su parte, en el experimento 2 se estudió la influencia del tipo de sustrato en la aclimatación de plantas *in vitro* de morera. Las plantas se seleccionaron con la mayor homogeneidad posible en relación con su longitud (2,5-3,0 cm). Se evaluaron tres mezclas de sustrato, seleccionadas de acuerdo con los resultados obtenidos en otros estudios con especies leñosas (Cholo-Masapanta y Delgado-Rodríguez, 2011). Los tratamientos fueron los siguientes: T1: suelo (70 %)-estiércol vacuno (20 %)-zeolita (10 %), T2: suelo (45 %)-estiércol vacuno (45 %)-zeolita (10 %), T3: suelo (90 %)-zeolita (10 %).

Mientras, en el experimento 3 se estudió el efecto del tipo de sustrato en el crecimiento de plantas provenientes de la fase de aclimatación en condiciones de vivero. Las plantas de morera aclimatizadas durante 30 días se extrajeron cuidadosamente de las bandejas para conservar el sustrato (mota), y se colocaron de forma individual en bolsas de polietileno negro que contenían diferentes mezclas de sustrato. Se evaluaron los siguientes tratamientos: T1: suelo (70 %)-estiércol vacuno (20 %)-zeolita (10 %), T2: suelo (45 %)-estiércol vacuno (45 %)-zeolita (10 %), T3: suelo (90 %)-zeolita (10 %). A los 30 días de sembradas se tomaron las 45 plantas de cada tratamiento, y se evaluaron las variables siguientes:

- Supervivencia (%): para su evaluación se consideró el total de plantas sembradas. Se empleó la fórmula:

$$\text{Supervivencia} = \frac{\text{NPV}}{\text{NTP}} \times 100$$

NPV: número de vitroplantas vivas

NTP: Número total de vitroplantas sembradas

- Longitud de las plantas (cm): se midió con una regla, desde la base del tallo hasta el ápice de la hoja superior.
- Número de hojas por planta: se determinó por conteo del número de hojas totalmente extendidas.
- Longitud de las hojas (cm): se midió con una regla, desde la inserción del limbo con el peciolo hasta el ápice de la hoja.
- Ancho de la hoja (cm): se midió con una regla, por la parte más ancha de la hoja.

Análisis estadístico. La normalidad se comprobó por la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y la homogeneidad de las varianzas, por el test de Levene. Para las variables que cumplieron con los supuestos se realizó un análisis de varianza; mientras que la variable supervivencia se procesó mediante un análisis de diferencias de proporciones. En los casos donde hubo diferencias significativas entre las medias, se aplicó la prueba de comparación múltiple de rango de Tukey para $p \leq 0,05$. Se utilizó el paquete estadístico Infostat 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017).

Resultados y Discusión

Influencia del tamaño en la aclimatación de las vitroplantas de morera

El adecuado tamaño y la buena calidad de las vitroplantas es un factor importante a considerar durante la fase de aclimatación, porque de ello dependerá la supervivencia, la velocidad de crecimiento y la producción final en la fase de campo.

Las vitroplantas cultivadas durante 30 días en condiciones *ex vitro* mostraron diferencias en la supervivencia; se alcanzaron valores significativamente superiores con las de menor longitud (1,5-2,5 cm) respecto al resto de los tratamientos, los cuales no difirieron entre sí (tabla 1). En todos los tratamientos la supervivencia se consideró alta; y las vitroplantas presentaban hojas turgentes, totalmente extendidas, de color verde oscuro característico de la especie.

Los buenos resultados en este indicador pudieron atribuirse al adecuado manejo durante esta fase,

Tabla 1. Influencia del tamaño en la aclimatización de vitroplantas de morera a los 30 días posteriores a la siembra.

Tratamiento	Supervivencia, %	Longitud, cm	Hojas/planta	Largo hoja, cm	Ancho hoja, cm
Pequeñas	93,6 ^a	7,68	6,65	3,77	2,83
Medianas	85,4 ^b	7,82	6,13	3,58	2,66
Grandes	84,8 ^b	8,05	6,75	3,76	2,74
EE ±	2,06	0,08	0,09	0,10	0,06

Medias con letras diferentes por columna difieren significativamente, según prueba de Tukey, para $p < 0,05$.

a las condiciones ambientales en las cuales se desarrolló el experimento y a las características de la especie, que la hacen resistente a las condiciones *ex vitro*. Ello coincide con lo obtenido por Pérez-Alonso *et al.* (2016) en la aclimatización de plantas *in vitro* de *Aloe vera* L. (sábila) y por Salas *et al.* (2011) en vitroplantas de morera, quienes consideran que las condiciones de cultivo en las cuales se desarrolla el proceso de aclimatización son determinantes para obtener altos valores de supervivencia.

El resto de las variables morfológicas no mostraron diferencias significativas en los tratamientos al final del periodo; sin embargo, debe destacarse que las plantas de menor tamaño alcanzaron los mayores incrementos en longitud (5,38 cm) y en número de hojas, lo que indica que fueron capaces de recuperarse más rápido del estrés inicial originado por el trasplante a condiciones *ex vitro* y reiniciar el crecimiento y desarrollo en un menor tiempo, en comparación con las de mayor tamaño; ello pudiera estar asociado a una mejor conformación y calidad del follaje y del sistema radical de las plantas de menor talla.

Palhares *et al.* (2004), al evaluar la influencia del tamaño de las plantas *in vitro* durante la aclimatización de *Eucalyptus urograndis* obtenidas en sistemas de inmersión temporal, obtuvo el mayor porcentaje de supervivencia (63 %) y los mayores valores en las variables de crecimiento (longitud, número de hojas y número de raíces emitidas) en las plántulas con menores tallas. Los autores concluyeron que, al parecer, no es la talla la variable que tiene mayor efecto en la supervivencia de las plántulas de *E. urograndis* durante la aclimatización, sino la calidad de los diferentes órganos que la conforman.

La calidad y el número total de hojas de las plantas tienen un efecto directo en el éxito de la aclimatización. En todos los tratamientos se observó un incremento en la emisión de hojas nuevas, sin diferencias significativas entre ellos, y tampoco hubo diferencias en el ancho y el largo de las hojas. La mayoría de los estudios del tejido foliar de las plantas que provienen de condiciones *in vitro*

refieren que el mesófilo de estas hojas posee un tejido en empalizada poco desarrollado, generalmente formado por una sola capa de células y en lo fundamental compuesto por tejido esponjoso con grandes espacios intercelulares (Molina-El-Hage *et al.*, 2008; Soares y Savonitti, 2016). Ello limita que tengan una óptima funcionalidad, por lo que la emisión de nuevas hojas en condiciones *ex vitro* causa directamente un mayor crecimiento y desarrollo de las plántulas, ya que alcanzan una mayor actividad fotoautotrófica.

Por su parte Albany *et al.* (2006), al establecer una metodología de propagación *in vitro* de la sábila, evaluaron la influencia del tamaño de las vitroplantas (pequeñas: < 5 cm, medianas: 5-10 cm, grandes >10 cm) durante la fase de aclimatización. No hubo diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia, en función del tamaño de las vitroplantas. Después de 60 días de adaptación a las condiciones *ex vitro* todas las plantas estaban vivas y mostraron un crecimiento uniforme, a pesar de las diferencias de tamaño al momento del trasplante.

Influencia del tipo de sustrato en la aclimatización de las vitroplantas de morera

Entre los factores con mayor influencia en la aclimatización de las vitroplantas se encuentra el tipo de sustrato y su composición, el cual determina una adecuada retención de humedad y los componentes químicos para proveer a la planta de agua y nutrientes; y, al mismo tiempo, ejerce una influencia significativa en la arquitectura del sistema radical, lo que influye en el estado nutricional y la translocación de agua en las plantas. Por ello, es necesario prestar especial atención a su selección y uso.

La supervivencia de las vitroplantas no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, con valores superiores al 80 %, los cuales pueden considerarse aceptables para las condiciones en las que se desarrolló el experimento (tabla 2).

Estos resultados pudieran estar asociados al manejo y a las condiciones en las cuales se mantuvieron las plantas durante la aclimatización: la hu-

Tabla 2. Efecto del tipo de sustrato en la aclimatación de plantas *in vitro* de morera a los 30 días posteriores a la siembra.

Tratamiento	Supervivencia, %	Longitud, cm	Número de hojas/planta	Largo hoja, cm	Ancho hoja, cm
T1	87,5	7,4 ^a	6,7 ^a	4,4 ^a	3,2 ^a
T2	88,6	7,1 ^a	6,5 ^a	4,4 ^a	3,1 ^a
T3	85,3	5,4 ^b	5,3 ^b	3,4 ^b	2,6 ^b
EE ±	2,36	0,080	0,090	0,100	0,060

Medias con letras diferentes en una misma columna difieren estadísticamente según Tukey para $p \leq 0,05$.

medad adecuada, que se garantizó por la frecuencia y el tipo de riego y por el uso de cobertores en la casa de cultivo; una iluminación moderada, a través de las mallas de sombreo; y el mantenimiento de las plantas *in vitro* durante la fase de multiplicación y enraizamiento en cámara de crecimiento con luz solar, con un fotoperiodo de 13-11 h de luz/oscuridad.

El estiércol, uno de los componentes utilizados en las mezclas de los sustratos, al añadirse al suelo, contribuye a mejorar sus propiedades biológicas y físico-químicas, ya que resulta una importante fuente de energía y de nutrientes para el ecosistema edáfico (Cairo-Cairo y Álvarez-Hernández, 2017).

La adición de zeolita a los sustratos favorece la aireación, la absorción de nutrientes por la planta y el mejor suministro de agua, lo que conduce a obtener una planta de excelente calidad fisiológica en la fase de aclimatación (Urbina-Sánchez *et al.*, 2006).

El tipo de sustrato empleado tuvo efecto significativo en el crecimiento y desarrollo de las plantas *in vitro* en la casa de cultivo. Los mejores resultados para todas las variables se obtuvieron al emplear el sustrato compuesto por 70 % de suelo-20 % de estiércol vacuno y 10 % de zeolita (T1), sin diferencias significativas con T2 (mezcla de 45 % de suelo-45 % de estiércol vacuno y 10 % de zeolita), pero significativamente superiores a T3 (mezcla de 90 % de suelo y 10 % de zeolita). Estos resultados indican el efecto beneficioso de la inclusión de estiércol vacuno en estas mezclas, lo cual pudiera estar asociado a la mejoría de las propiedades físicas del sustrato y al contenido de nutrientes y materia orgánica que se logra con la adición del estiércol.

Resultados similares en la variable supervivencia fueron informados por Salas *et al.* (2011), quienes hallaron valores superiores al 90 % en vitroplantas de *M. alba* provenientes de sistemas de inmersión temporal y de medios de cultivo semisólidos en diferentes sustratos y mezclas de sustratos compuestos por zeolita y humus de lombriz.

Al respecto, Clapa *et al.* (2015) reportaron 90 % de supervivencia en vitroplantas de *Morus nigra* L. cuando utilizaron mezclas de sustratos sólidos comerciales. Sin embargo, en un estudio para la aclimatación de plantas *in vitro* de esta especie, en el que se utilizó como sustrato una mezcla de suelo, vermicompost y arena (1:1:2), Gogoi *et al.* (2017) observaron un severo marchitamiento y baja supervivencia (40 %) cuando las plantas fueron transferidas directamente al invernadero, lo cual fue atribuido al poco desarrollo de los estomas y de la cera epicuticular, que ocasionó la pérdida de agua en la superficie de las hojas.

Por su parte, Indacochea-Ganchozo *et al.* (2017) evaluaron la aclimatación de tres especies forestales en peligro de extinción [*Myroxylon balsamum* (L.) Harms, *Tabebuia crhysantha* y *Tabebuia billbergii* (Bureau & K.Schum.) Standl.], con el empleo de un sustrato compuesto por 40 % de arena de río, 40 % de humus de lombriz y 20 % de aserrín de madera descompuesta. La aclimatación de las vitroplantas de las tres especies se logró en un periodo de diez semanas, con una supervivencia de 65, 80 y 70 %, respectivamente; y las vitroplantas alcanzaron un tamaño entre 17,07 y 19,53 cm y un número de hojas que varió entre 7 y 14 por planta.

Efecto del tipo de sustrato en el crecimiento de vitroplantas en condiciones de vivero

En la mayoría de los cultivos, las plantas obtenidas por cultivo de tejidos requieren ser trasplantadas a bolsas de polietileno hasta que las vitroplantas alcancen los requerimientos de calidad para su plantación en condiciones de producción.

Las variables longitud de las plantas y número de hojas por planta fueron significativamente superiores en T1 y T2, en comparación con T3 (tabla 3); mientras que las variables largo y ancho de la hoja no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. Los resultados pueden estar dados por la inclusión de estiércol vacuno en los

Tabla 3. Influencia del tipo de sustrato sobre el desarrollo de vitroplantas de morera en condiciones de vivero.

Tratamiento	Longitud, cm	Número de hojas/planta	Largo hoja, cm	Ancho hoja, cm
1	20,7 ^a	5,6 ^a	10,0	7,1
2	18,9 ^a	5,5 ^a	9,9	7,3
3	12,7 ^b	4,6 ^b	9,7	6,9
EE ±	0,780	0,130	0,190 n.s	0,130 n.s

Medias con letras diferentes por columna difieren significativamente según prueba de Tukey para $p < 0,05$.

sustratos de T1 y T2, el cual contribuye a mejorar las propiedades físicas y químicas de los suelos y es una fuente de materia orgánica y nutrientes que favorece el desarrollo de las plantas

En una investigación realizada por Vilchez *et al.* (2015), se comparó el crecimiento en vivero de plántulas y vitroplantas de guayabo cv. Enana Roja Cubana EEA-1840, sobre un sustrato compuesto por una mezcla de abono y arena lavada de río en proporción 3:1. Durante los 70 días después del trasplante, se evaluaron con una frecuencia quincenal los componentes fisiológicos del crecimiento, tales como: acumulación de materia seca, tasa de crecimiento del cultivo, índice de crecimiento relativo, tasa de asimilación neta, área foliar, número de hojas y longitud del tallo y de la raíz. Durante los primeros 28 días después del trasplante, las plántulas superaron a las vitroplantas en acumulación de materia seca y en crecimiento; pero posteriormente, y hasta culminar el período de evaluación, las vitroplantas superaron a las plántulas en los indicadores evaluados. Tales resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo, donde se observó un crecimiento y desarrollo de las vitroplantas a medida que transcurrió el tiempo de aclimatación; al final del periodo de evaluación se obtuvieron plantas normales y vigorosas, con la talla apropiada para ser plantadas en el campo.

Por su parte, Adriano-Anaya *et al.* (2013) investigaron el uso de compost durante la etapa de aclimatación de vitroplantas de banano clon Gran Enano (*Musa AAA*) en bolsas de polietileno. Los resultados indicaron que el desarrollo de las plantas fue inhibido en los sustratos con más de 30 % de compost, lo que se atribuyó a un posible efecto de fitotoxicidad causado por las características químicas de los sustratos de siembra, por lo que los autores asumieron que el contenido de sales en los sustratos pudo ser el factor que limitó el desarrollo de las plantas. En la presente investigación los sustratos no mostraron fitotoxicidad en ninguna de las combinaciones empleadas.

Se concluye que el empleo de plantas *in vitro* con un tamaño entre 1,5 y 2,5 cm y mezclas de sustratos compuestas por suelo-estiércol vacuno y zeolita en una relación 70-20-10 % y 45-45-10 % durante la aclimatación permitió alcanzar altos valores de supervivencia y mayor crecimiento y desarrollo de las plantas de *M. alba*.

Agradecimientos

Al Programa VLIR-UOS de Bélgica, que aportó los fondos para la ejecución del proyecto «Biotecnología *in vitro* de plantas para el incremento de la seguridad alimentaria en la región oriental de Cuba».

Referencias bibliográficas

- Adriano-Anaya, María de L.; Lara-Pérez, Yeyetsit; Ramos-Pérez, Dory G.; Vázquez-Ovando, A. & Salvador-Figueroa, M. Uso de compost durante la etapa de aclimatación de vitroplantas de banano clon "Gran Enano" (*Musa AAA*). *Quehacer Científico en Chiapas*. 8 (2):61-67, 2013.
- Albany, N.; Vilchez, J.; León-de-Sierralta, S.; Molina, M. & Chacón, P. Una metodología para la propagación *in vitro* de *Aloe vera* L. *Rev. Fac. Agron., LUZ*. 23 (2):215-224, 2006.
- Cairo-Cairo, P. & Álvarez-Hernández, U. Efecto del estiércol en el suelo y en el cultivo de la soya (*Glycine max* (L.) Merr.). *Pastos y Forrajes*. 40 (1):37-42, 2017.
- Castro-Ramírez, A. *Cultivo de morera (Morus spp) y su uso en la alimentación animal*. (Eds. A. Castro-Ramírez y E. Orozco-Barrantes). San José, Costa Rica: Publicaciones INTA, 2010.
- Cholo-Masapanta, L. F. & Delgado-Rodríguez, H. B. *Formación de callos en el cultivo de la morera (Morus alba L.)*. Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Bayamo, Cuba: Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Granma, 2011.
- Clapa, Doina; Fira, A. & Simu, Manuela. The role of rooting substrate in blackberry *ex vitro* rooting and acclimatization stage. *ProEnvironment*. 8:280-284, 2015.

- Di Rienzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, Mónica G.; Gonzalez, Laura A.; Tablada, M. & W., Robledo C. *InfoStat 2017*. Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.infostat.com.ar>, 2017.
- Gogoi, G.; Borua, P. K. & Al-Khayri, J. M. Improved micropropagation and *in vitro* fruiting of *Morus indica* L. (K-2 cultivar). *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 15 (1):249–256, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.02.005>.
- Huh, Y. S.; Lee, J. K. & Nam, S. Y. Improvement of *ex vitro* acclimatization of mulberry plantlets by supplement of abscisic acid to the last subculture medium. *J. Plant Biotechnol.* 44 (4):431–437, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5010/JPB.2017.44.4.431>.
- Indacochea-Ganchozo, Blanca; Parrales-Villacreses, J.; Castro-Piguave, C.; Vera-Tumbaco, M. & Gabriel-Ortega, J. *In vitro* acclimatization of native forest species from Manabí southern in danger of extinction. *J. Selva Andina Res. Soc.* 8 (2):124–134, 2017.
- Martín, G. J; Pentón, Gertrudis; Noda, Yolai; Contino, Y.; Díaz, Maykelis; Ojeda, F. *et al.* Comportamiento de la morera (*Morus alba* L.) y su impacto en la producción animal y la crianza del gusano de seda en Cuba. *Rev. cubana Cienc. agríc.* 48 (1):73–78, 2014.
- Molina-El-Hage, L. A.; González-Olmedo, J. L.; Fundora, Zaida; Abduknour, J.; Desjardins, Y. & Escalona, Maritza. Acclimatización *in vitro* y *ex vitro*: una estrategia para mejorar la productividad de la micropropagación de plantas. *Revista: Biotecnología*. 15. https://www.researchgate.net/publication/311736525_Aclimatizacion_in_vitro_y_ex_vitro_una_estrategia_para_mejorar_la_productividad_de_la_micropropagacion_de_plantas_Revista_Revive_Biotecnologia_Bolivia_15_2008, 2008.
- Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant.* 15:473–497, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Noda-Leyva, Yolai & Martín-Martín, G. J. Efecto de la distancia de siembra en el rendimiento de *Morus alba* (L.) var. yu-12. *Pastos y Forrajes*. 40 (1):23–28, 2017.
- Palhares, G. A.; Rodríguez, R.; Cid, Marieta; Pina, D. & González-Olmedo, J. L. Efecto de un análogo de brasinoesteroides (MH5) en la propagación de *Eucalyptus urograndis* en biorreactores de inmersión temporal. *Cultivos Tropicales*. 25 (1):39–44, 2004.
- Pérez-Alonso, N.; Capote, A.; Pérez, A.; Gómez, L. & Chong, B. Efecto del sustrato en la aclimatización de plantas *in vitro* de *Aloe vera* L. *Biotecnología Vegetal*. 16 (3):161–169, 2016.
- Resende, C. F.; Bianchetti, R. E.; Oliveira, Aline M. S. de; Braga, Virginia F. & Peixoto, P. H. P. *In vitro* propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, an endemic species of Brazilian Campos Rupestres. *Rev. Ciênc. Agron.* 46 (3):582–589, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20150041>.
- Salas, J.; Agramonte, D.; Barbón, R.; Jiménez, T.; Collado, L.; Pérez, R *et al.* Propagación *in vitro* de *Morus alba* L. en medio de cultivo semisólido. *Biotecnología Vegetal*. 5 (81):70–84, 2005.
- Salas, J.; Agramonte, D.; Jiménez-Terry, F.; Pérez, M.; Collado, R. & Barbón, R. Propagación de plantas de *Morus alba* var. Criolla con el uso de sistemas de inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal*. 11 (2):77–88, 2011.
- Silva, J. T. da; Hossain, M. M.; Sharma, M.; Dobránszki, Judit; Cardoso, J. C. & Zeng, S. Acclimatization of *in vitro* derived *Dendrobium*. *Horticultural Plant Journal*. 3 (3):110–124, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.07.009>.
- Soares, B. S. & Savonitti, V. Rooting *in vitro* and *ex vitro* acclimatization of citrus cultivars. *Rev. de Ciências Agrárias*. 59 (2):144–151, 2016.
- Urbina-Sánchez, Elizabeth; Baca-Castillo, G. A.; Núñez-Escobar, R.; Colinas-León, R.; Colinas-León, María T.; Tijerina-Chávez, L. *et al.* Cultivo hidropónico de plántulas de jitomate en zeolita cargada con K¹⁺, Ca²⁺ o Mg²⁺ y diferente granulometría. *Agrociencia*. 40 (4):419–429, 2006.
- Vijavan, K.; Javarama, R.; Tikader, A. & Saratchandra, B. Biotechnology of mulberry (*Morus* L.). A review. *Emir. J. Food Agric.* 26 (6):472–496, 2014. DOI: <https://doi.org/10.9755/efja.v26i6.18019>.
- Vílchez, J.; Martínez, L. & Albany, M. Comparación del crecimiento en vivero entre plántulas y vitropiantas de guayabo cultivar enana roja cubana eea-1840. *Interciencia*. 40 (4):270–274, 2015.