

Propagación *in vitro* de la morera (*Morus alba* L.) cv. híbrido IZ 16/8

Rafael Gómez-Kosky*, María del C. Hernández-León, Lissabel López-Díaz, Legna de la C. Martínez-Ojeda, Ada T. Aguiar-Fernández, Jericy Álvarez-Ferreiro, Aydiloide Bernal-Villegas

Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA) UEB INICA-Villa Clara
Autopista Nacional, km 246, Ranchuelo. Villa Clara, Cuba

*rafael.kosky@inicauc.azucuba.cu

RESUMEN

Introducción. En Cuba se investiga sobre el uso de otras especies de plantas arbustivas, como fuente de proteína para el alimento animal, de forma directa o para la elaboración de piensos; sin embargo, estas nuevas especies necesitan de semilla para su generalización en el país y, para ello, son necesarios protocolos eficientes con los que se obtengan plantas para su generalización.

Objetivo. Desarrollar una metodología de propagación *in vitro* en morera cv. híbrido IZ 16/8, a través de la organogénesis directa.

Materiales y métodos. Se realizaron diferentes experimentos para el desarrollo de las fases de establecimiento, multiplicación y enraizamiento; para ello, se evaluaron diferentes tiempos de exposición al NaClO, concentraciones de las sales MS (50-100 %), mioinositol, así como diferentes reguladores del crecimiento del tipo auxina, citoquininas y floriglucinol.

Resultados y discusión. Establecimiento, *in vitro*, de yemas axilares del cultivar híbrido IZ 16/8, con el uso de plantas madres de morera, cultivadas en condiciones semicontroladas. El proceso de desinfección empleado, con hipoclorito de sodio al 1.0 %, durante 25 minutos, fue el más efectivo. La mejor concentración de citoquinina para la fase de multiplicación del cultivar híbrido fue 0.5 mg L⁻¹ de 6-BAP. En ningún caso existe presencia de callo basal en los brotes *in vitro*, debido a la utilización de floriglucinol en los medios de cultivos.

Conclusiones. El empleo de la auxina AIB y el floriglucinol tuvieron un efecto positivo en el enraizamiento de los brotes en un 85.0 %.

Palabras clave: propagación *in vitro*, floriglucinol, establecimiento *in vitro*, callo basal, plantas proteicas.

ABSTRACT

Introduction. In Cuba, research is being conducted into the use of other shrub species as a source of protein for animal feed, either directly or for animal feed. However, these new species require seeds to be widely cultivated in the country, and to do so, efficient protocols are needed to obtain plants for their widespread use.

Objective. To develop an *in vitro* propagation methodology for hybrid mulberry cv IZ 16/8, using direct organogenesis.

Materials and methods. Different experiments were carried out for the development of the phases of establishment, multiplication and rooting. For this, different exposure times to NaClO, concentrations of the MS salts (50-100 %), myo-inositol, as well as different auxin-type growth regulators, cytokinins and phloroglucinol were evaluated.

Results and discussion. *In vitro* establishment of axillary buds of the hybrid cultivar IZ 16/8 using mulberry mother plants grown under semi-controlled conditions. The disinfection process used, with 1.0 % sodium hypochlorite for 25 minutes, was the most effective. The optimal cytokinin concentration for the multiplication phase of the hybrid cultivar was 0.5 mg L⁻¹ of 6-BAP. In no case was basal callus present on the *in vitro* shoots, due to the use of phloroglucinol in the culture media.

Conclusions. It was shown that the use of auxin AIB and phloroglucinol had a positive effect on the rooting of shoots by 85.0 %.

Keywords. *In vitro* propagation, phloroglucinol, *in vitro* establishment, basal callus, protein plants

INTRODUCCIÓN

La necesidad de producir alimentos para garantizar la soberanía alimentaria del país precisa de alternativas para enfrentar esta actividad, de forma creativa. La utilización de árboles en los sistemas de producción ganaderos, en el trópico y en particular en Cuba, es una práctica antigua pues, históricamente, los árboles han sido un componente importante en la ganadería vacuna, por el servicio que prestan, como: sombra, cercas vivas y fuente de madera; incluso, ha sido frecuente encontrar árboles frutales como mango, tamarindo, marañón y otros en fincas campesinas. Pero en general, eran solo elementos del entorno agroecológico existente (1).

Entre los años 2010 y 2012, y a iniciativa del Comandante en Jefe Fidel Castro, se comenzaron los trabajos de investigación para el uso de otras especies de plantas arbustivas como fuente de proteína para alimento animal, de forma directa o para la elaboración de piensos. Sin embargo, estas nuevas especies y cultivares, para su generalización en el país, necesitan de semilla, por lo que se precisa de protocolos eficientes para la obtención de estas especies, a lo largo de todo el país.

Investigaciones realizadas por el Instituto de Ciencia Animal (ICA) y la Estación de Pastos y Forrajes Indio Hatuey, en 2020, mostraron que la morera es una de las plantas con mayor potencial para la alimentación de los rumiantes y destacó sus elevados niveles de proteína cruda y digestibilidad, además de su capacidad de rebrote (2).

Debido a la alta concentración de proteínas en el follaje de estas plantas, su empleo implica la reducción de otros recursos alimenticios convencionales y costosos, como la harina de soya, comunes en la dieta de animales monogástricos. Sus propiedades medicinales inciden de forma positiva en la salud de los animales, por lo que se requieren menos medicamentos. Varios estudios registran una alta productividad animal asociada con la introducción de plantas proteicas en su alimentación y destacan, además, las facilidades para su cultivo (3).

La propagación de la morera (*Morus alba* L.) se realiza, generalmente, por estacas. 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 (4). La propagación *in vitro* de especies vegetales ha surgido como una alternativa valiosa para la expansión 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 (5).

El híbrido de morera IZ 16/8, originario de Brasil e introducido en Cuba por el Centro de Investigaciones en Plantas Proteicas y Bioproductos Naturales, tiene como características hojas glabras con cuatro o cinco lóbulos profundos, no produce semillas botánicas y es difícil su estaquillado, por lo que el uso de las estacas como material de propagación de este cultivar híbrido presenta baja eficiencia (3), de ahí que el objetivo de esta investigación sea desarrollar una metodología de propagación *in vitro* de morera cv. IZ 16/8, mediante la organogénesis directa.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el Complejo Científico-Productivo de Biotecnología, en las áreas del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Villa Clara (UEB INICA-Villa Clara), que se encuentra en el municipio de Ranchuelo, provincia de Villa Clara. Los experimentos se desarrollaron en el período comprendido entre enero de 2022 y mayo de 2023.

Procedimientos generales

Esterilización del medio, frascos de cultivo e instrumental

Los medios, tubos y frascos de cultivo utilizados fueron esterilizados en autoclave vertical, a 121 °C y 1.2 kg cm⁻² de presión. Los platos metálicos para el trabajo en la cabina de flujo laminar fueron esterilizados en la estufa a 180 °C, durante 2 h. El instrumental (pinzas y bisturíes) se desinfectó en un esterilizador eléctrico modelo DENT-EQ (Alemania), que permaneció dentro de la cámara de flujo laminar horizontal, en la que se realizó el manejo del material vegetal en condiciones de esterilidad.

Condiciones de cultivo in vitro

De manera general, los tubos y frascos de cultivo de todos los experimentos se colocaron en cámara de crecimiento climatizada, a una temperatura de 27 ± 2 °C con luz solar, con un fotoperiodo de 12.5 / 11.5 h de luz / oscuridad, con un rango de Densidad de Flujo de Fotones Fotosintéticos (DFFF) entre 47.1 y 64.6 μmol m⁻² s⁻¹; medido con un luxómetro PCE-174 Instruments (España). En posteriores epígrafes se especificaran otras condiciones de cultivo.

Banco de donantes semicontrolado

El Banco de donantes semicontrolado, ubicado en áreas del INICA-Villa Clara, está construido sobre una estructura metálica de hierro galvanizado, cubierta con material plástico (filme de polietileno) transparente (Rafia). La altura de la estructura es de 4.00 m en la parte alta y 2.20 m en la baja. Por encima de este se encuentra una malla semisombra de 50 % (Sarán), para reducir la intensidad lumínica y evitar quemaduras en las hojas por temperaturas muy altas, dentro del Banco de donantes semicontrolado. Además, fueron cubiertos sus lados con una malla plástica antiáfidos y todo el piso fue cubierto con zeolita.

Se utilizaron, para plantación de las posturas (20 en total), tanques plásticos, con una capa de grava en el fondo y rellenos con una mezcla de compost de cachaza y zeolita 3:1 (v/v) para un volumen de 20 m³; además, protección fitosanitaria con badén para los pies y un lavamanos con formol o hipoclorito de sodio, al 0.1 %. El riego se realizó con microaspersores, dos veces por día, sobre todo en el horario del mediodía y la tarde, momentos en que las temperaturas son más altas.

Previamente, a los 2 meses de plantadas, se les realizó una poda de la yema apical, que provocó la brotación y crecimiento de las yemas laterales. Además, a las plantas madre se les realizaron pretratamientos con diferentes productos. A las plantas madres de Sacha inchi se les realizaron pretratamientos con diferentes productos, como: FITOMAS-E®, (ICIDCA, Cuba) 1 mL L⁻¹, fertilizante foliar Bayfolan forte®, (Bayer Crop Science, Alemania) 2 mL L⁻¹ y fungicida sistémico Regnum® 0.65 mL L⁻¹ (BASF, Alemania) por mochila, respectivamente. Una vez por semana, durante los primeros tres meses, se les aplicaron con mochila de aspersión (Matabi, España) de 16 L de capacidad, con boquilla de inundación (*flood-jet*) Lurmark AN 2.5, con una presión de 1.5 a 2.0 bar, según los parámetros técnicos de la mochila. A partir de los 4 meses se les realizaron aplicaciones foliares de urea (10 g L⁻¹) cada 15 días. Todo esto para contar con un material vegetal con una mayor calidad sanitaria y fisiológica y lograr una mejor respuesta en la fase de establecimiento *in vitro*.

Condiciones de limpieza y prevención de enfermedades

Todas las herramientas y material de trabajo (tijeras de podar, cuchillos, rastrillo manual, regaderas, mochila de fumigación) fueron utilizados solo para esta área de trabajo y así evitar contaminación con microorganismos patógenos. En el momento de la toma de las yemas, para el establecimiento *in vitro*, se empleó una tijera de podar previamente desinfectada y, antes de usarla en la próxima planta, se desinfectó con etanol al 70 % o hipoclorito de sodio al 0.1 %. Semanalmente, las hojas secas y sus restos fueron eliminados para garantizar una mayor sanidad.

Condiciones de cultivo del Banco de donantes semicontrolado

Densidad de Flujo de Fotones Fotosintéticos (DFFF), en un rango de 209.4 a 1036 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, medido con el auxilio de un luxómetro digital (modelo Multimatrix LM 76, E.U.A). Los valores de Humedad relativa (HR) estuvieron entre un mínimo de 49.5 % y un máximo de 81.9 %; asimismo, los valores de temperatura entre un mínimo de 27.1 °C y un máximo de 39 °C, medida con la utilización de un termohigrómetro (modelo Ebro Electronic® TFH 620, EUA).

Establecimiento in vitro

Selección de los explantes de partida

Del Banco de donantes semicontrolado se tomaron las plantas madre, de ellas se seleccionaron ramas jóvenes, en pleno crecimiento, entre cuatro y cinco meses de edad. La toma de los explantes (segmentos nodales) fue realizada en horas tempranas de la mañana, previa suspensión del riego por tres días. Se tomaron las yemas axilares, con auxilio de una tijera de podar desinfectada, previamente, con etanol al 70 %. Estas fueron rápidamente sumergidas en agua desmineralizada, dentro de un frasco plástico, que se llevó al laboratorio donde se comenzó su proceso de desinfección.

Efecto del tiempo de exposición al NaClO

En el laboratorio se realizaron los diferentes pasos del procedimiento de desinfección a las yemas. Lavado con agua bajo la llave entre 30 y 45 minutos, la boca del frasco se tapó con malla para permitir el paso del agua e impedir la salida de las yemas. Al término de este tiempo se realizó un lavado con detergente doméstico, al que se le adicionaron 3-5 mL por cada 250 mL de agua; posteriormente, fueron enjuagadas con agua para eliminar los restos de este.

El material vegetal se transportó hacia la cabina de flujo laminar donde se continuó el proceso de desinfección. Los explantes se introdujeron en un vaso de precipitado, esterilizado anteriormente en autoclave, con etanol al 70 %, durante un min, en constante agitación; el etanol debe cubrir los explantes para una mejor desinfección. Transcurrido este tiempo se retiró el etanol con el auxilio de una pinza estéril, los explantes se colocaron en un Erlenmeyer, previamente esterilizado en autoclave, con una solución de hipoclorito de sodio al 1.0 % (v/v), durante 15, 20 y 25 min, este fue colocado en un agitador orbital a una velocidad de 70 rpm. Pasado este tiempo se realizaron tres enjuagues a las yemas, con agua desmineralizada estéril; posteriormente, se introdujeron en un vaso de precipitado con 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico. Este fue el explante utilizado durante el establecimiento *in vitro* de la morera cv. híbrido IZ 16 / 8.

Una vez realizada la desinfección de los segmentos nodales se siguieron los pasos para el establecimiento de los explantes, en la cabina de flujo laminar: primero, se redujo el tamaño del explante a 1.5 - 2.0 cm, aproximadamente; a continuación, se introdujeron en los tubos de cultivo de vidrio de un tamaño de 16 x 2 cm, con 2.0 mL de una solución de 10 g L⁻¹ de sacarosa con agua desmineralizada, para evaluar la contaminación microbiana. Los tubos fueron tapados con lámina de aluminio de 0.2 μM , se emplearon 25 tubos por tratamiento.

En todos los tratamientos se evaluó la variable:

- a los 10 días de cultivo: número de explantes contaminados con bacterias y hongos (porcentaje) y con oxidación fenólica o amarronamiento (porcentaje).

Efecto de componentes del medio de cultivo

El objetivo del experimento fue evaluar el efecto de las concentraciones de sales y el mio-inositol en el establecimiento *in vitro* de las yemas axilares.

Medio de cultivo

Se utilizó un medio de cultivo basal, compuesto por sales (6) (MS), vitaminas (7) 100 %, 2.0 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (6-BAP), 0.023 mg L⁻¹ de ácido indol-butírico (AIB), sacarosa de 30 g L⁻¹ y gelificado

con 6 g L⁻¹ de agarE (BIOCEN, Cuba). El pH fue ajustado a 5.7, con NaOH (1.0 N) y HCl (1.0 N), previo a la esterilización en autoclave.

Se estudiaron dos concentraciones de las sales MS (50 y 100 %) y dos concentraciones de mio-inositol (100 y 2.0 mg L⁻¹). Se emplearon 30 tubos por tratamiento, con un explante cada uno.

En los cuatro tratamientos se evaluaron las variables:

- a los 15 días de cultivo: número de explantes contaminados con bacterias y hongos (porcentaje) y con oxidación fenólica o amarronamiento (porcentaje).
- a los 30 días de cultivo: el número de explantes vivos, número de explantes muertos, número de explantes brotados (porcentaje) y reducción o no del tamaño de las hojas.

Multiplicación in vitro

Los brotes *in vitro* obtenidos en la fase de establecimiento fueron colocados en el medio de cultivo de multiplicación. Se tomó la mejor concentración de sales y mio-inositol del medio de cultivo de establecimiento y se evaluaron diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento (axinas y citoquininas).

Medio de cultivo

Se utilizó un medio de cultivo compuesto por sales (6) (MS), tiamina 1.0 mg L⁻¹, sacarosa de 30 g L⁻¹ y gelificado con 6 g L⁻¹ de agarE (BIOCEN, Cuba). El pH fue ajustado a 5.7, con NaOH (1.0 N) y HCl (1.0 N), previo a la esterilización en autoclave.

Tratamientos:

- 0.5 mg L⁻¹ de 6 bencilaminopurina (6 BAP) + 0 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) + 30.0 mg L⁻¹ de floriglucinol
- 0.5 mg L⁻¹ de 6 bencilaminopurina (6 BAP) + 0.2 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) + 30.0 mg L⁻¹ de floriglucinol
- 0.5 mg L⁻¹ de 6 bencilaminopurina (6 BAP) + 0.3 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) + 30.0 mg L⁻¹ de floriglucinol
- 0.5 mg L⁻¹ de 6 bencilaminopurina (6 BAP) + 0.2 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) + 0 mg L⁻¹ floriglucinol (8) (control).

Los explantes fueron colocados en frascos de cultivo de vidrio de 250 mL de volumen total, con 30 mL de ambos medios de cultivo. Se colocaron 3 explantes por frasco, para un total de 30 por tratamiento. Los frascos fueron tapados con papel de aluminio doble.

A todos los tratamientos, a los 30 días de cultivo, se les evaluaron las variables:

- altura (cm),
- coeficiente de multiplicación (número de segmentos nodales por brote),
- número de hojas,
- formación de callo basal (porcentaje).

Enraizamiento in vitro

Se emplearon brotes *in vitro*, que procedían del mejor medio de cultivo de multiplicación. Los brotes para el experimento fueron seleccionados con una longitud entre 2.0 y 3.0 cm y tenían seis subcultivos de multiplicación.

Se evaluaron cuatro concentraciones de la auxina AIB (0.0; 0.5; 0.75; 1.0 mg L⁻¹) en el medio de cultivo de enraizamiento que estuvo, además, compuesto por las sales MS al 50 %, 1.0 mg L⁻¹ de tiamina, 30 mg L⁻¹ de floriglucinol, 30 g L⁻¹ de sacarosa. Se utilizaron un total de 30 explantes por tratamiento y se colocaron 3 brotes *in vitro* por frasco de cultivo.

A los 30 días de cultivo, al 100 % de los brotes o plantas *in vitro* por tratamiento les fueron evaluadas las variables:

- altura (cm),
- número de hojas,
- número de planta con raíces (expresado en porcentaje),
- número de raíces,
- longitud de la raíz más larga (cm).

Un grupo de plantas *in vitro* enraizadas fueron llevadas a condiciones de aclimatización para evaluar su supervivencia y crecimiento en condiciones semicontroladas de cultivo.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado. En el análisis de la normalidad de las variables se utilizó la prueba de Shapiro Wilk y la homogeneidad de varianza por Levene. Se empleó el Paquete estadístico SPSS versión 23.0 del 2015 para Windows (IBM, 2013) y STATISTICA versión 12.0, para la variable expresada en porcentaje, la diferencia entre los valores se determinó mediante la prueba de comparación de proporciones para dos muestras. Para la comparación entre las medias se aplicó un Análisis de varianza (ANOVA simple) y la diferencia entre las medias se determinó por la prueba de Tukey. En todos los casos las diferencias significativas fueron establecidas para $p < 0.05$. Todos los experimentos fueron repetidos dos veces.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del tiempo de exposición al NaClO

Los resultados alcanzados con el protocolo de desinfección empleado y, finalmente, la concentración de hipoclorito (1 %), durante un tiempo de exposición de 25 min, permitieron eliminar la contaminación por bacterias y hongos con un 90.0 % de establecimiento. En los dos últimos tratamientos estudiados no se encontró contaminación por hongos, esto puede deberse al pretratamiento a las plantas madre con el fungicida sistémico Regnum®, dos semanas antes de la toma de los segmentos nodales en el Banco de donantes semicontrolado, en condiciones semicontroladas (tabla 1).

Tabla 1. Efecto del tiempo de exposición de los explantes de morera (*Morus alba* L.) cv híbrido IZ/16-8 al hipoclorito de sodio a los 10 días de cultivo *in vitro*

Solución NaOCI (v/v) (%)	Tiempo (min.)	Contaminación (%)			Oxidación fenólica (%)	Muertos (%)	Vivos (%)
		Bacterias	Hongos	Total			
1.0	15	33.3	13.3	46.6 a	16.6 a	0.0 b	100.0 a
1.0	20	10.0	0.0	10.0 b	16.8 a	7.4 a	92.6 b
1.0	25	0.0	0.0	0.0 c	18.3 a	10.0 a	90.0 b

Porcentajes con letras distintas en una misma columna difieren significativamente para $p < 0.05$ según la Prueba de proporciones ($n=50$).

Los resultados alcanzados demuestran la influencia del genotipo con el que se trabaja, en un mayor o menor éxito en el establecimiento *in vitro*. Además de la influencia de la especie y sus características botánicas, que pueden permitir o no mayor acumulación de microorganismos, si se compara con resultados similares en otras especies como manzano (*Malus domestica* L.) y ciruelo (*Prunus domestica* L.), según señalaron Guevara *et al.* (9).

Son necesarias, en esta fase, altas garantías de asepsia tanto ambiental como material *in vitro*, especialmente en esta última, pues cualquier laboratorio necesita disponer de un número considerable de explantes en esta fase, ya que constituye la base material para la propagación subsiguiente. Por lo anteriormente planteado, la eficiencia tecnológica de esta fase es decisiva para alcanzar los resultados finales de la producción en las biofábricas, por ser la generadora de las cantidades de plantas que se establecerán.

Según plantean Guevara *et al.* (9) el establecimiento de plantas leñosas en cultivo *in vitro* es un paso difícil; sin embargo, en el presente trabajo fue posible alcanzar resultados positivos. La desinfección de los explantes es un paso esencial para el éxito del cultivo *in vitro*. La contaminación puede originarse por contaminantes que vienen adheridos a la superficie del explante o por fallas en los procedimientos de laboratorio. El mantenimiento de plantas donadoras bajo condiciones de invernadero o vivero y pretratarlas con sustancias antimicrobianas disminuye los procesos de infección (10). Esto permitió lograr el establecimiento de cultivos axénicos y fisiológicamente vigorosos con los cuales iniciar el proceso de multiplicación.

La superficie de los tejidos de las plantas constituye hábitats para los microorganismos, estos pueden alojarse en estomas, lenticelas o cualquier otra abertura natural, lo cual dificulta en extremo su eliminación. Entre los problemas más frecuentes se encuentran las infecciones, debido a la superficie pilosa, bacterias endógenas; en el caso del amarronamiento de los explantes las causas son debido a la oxidación fenólica. Con las condiciones de cultivo utilizadas en la presente investigación se alcanzaron niveles aceptables (de 16.6 a 18.3 %) de oxidación de los fenoles en la base de los explantes.

Varios autores se refieren a la importancia del protocolo de desinfección en el establecimiento *in vitro* de especies leñosas, lo que hace que varíen los porcentajes de contaminación; sin embargo, tratamientos entre un 0.75 y 1.0 % de NaClO, en dependencia del tipo de especie vegetal, han resultado muy efectivos en el control de la contaminación (11). Similares resultados se han obtenido en el presente trabajo, de manera general, con 10 % de contaminación, 7.4 % de muerte y una supervivencia entre 90.0 y 92.6 %.

En la presente investigación se logró un bajo porcentaje de contaminación y alto porcentaje de respuesta con hipoclorito de sodio al 1.0 %, con un tiempo de exposición de los explantes de 25 min, este resultado apoya lo informado por Viquez (12).

Efecto de componentes del medio de cultivo

Los mejores resultados se alcanzaron con la combinación del 50.0 % de las sales MS y 2.0 mg L⁻¹ de mio-inositol, en la que el 100 % de las yemas que no se contaminaron crecieron y formaron un brote *in vitro* con hojas normales, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos, además de tener muy bajos porcentajes de explantes con oxidación fenólica (tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la concentración de sales y el mio-inositol en el establecimiento *in vitro* de yemas axilares de morera (*Morus alba* L.) cv. híbrido IZ 16/8 a los 15 y 30 días de cultivo

Sales MS (%)	Mio-inositol (mg L ⁻¹)	Oxidación (%)	Contaminación (%)			Muerto (%)	Vivo (%)	Brotados (%)	Reducción
			Bacterias	Hongos	Total				Tamaño de hojas
100	100	17.0 a	12.0	6.0	18.0 a	7.0 a	58.0 b	88.0 b	no
100	2	4.2 b	11.0	3.0	14.0 a	6.0 a	55.4 b	100 a	si
50	100	18.4 a	9.8	2.4	12.2 a	4.0 a	78.7 a	83.0	no
50	2	5.0 b	10.0	4.0	14.0 a	5.0 a	76.0 a	100 a	si

Porcentajes con letras distintas en una misma columna difieren significativamente para $p < 0.05$ según la Prueba de Proporciones. (n=60).

El mayor potencial osmótico del medio de cultivo MS 50.0 % favoreció una mayor hidratación de los brotes, pero la cantidad de nutrientes que aportó no fue suficiente para su crecimiento adecuado. En tanto el menor potencial osmótico del medio de cultivo con las sales MS 100 % dificultó la absorción de agua y de nutrientes.

Según informaron Morard y Henry (13), el potencial osmótico del medio de cultivo tiene efecto directo en el crecimiento de los explantes, pues conforme se reduce también es menor la absorción de agua y nutrientes, lo que dificulta el crecimiento y multiplicación de brotes *in vitro*. Por su parte, Pierik (14) señaló que la concentración total de las sales de un medio de cultivo determina su potencial osmótico de modo que, al aumentar la concentración de iones en la solución, el potencial osmótico se reduce (15), al igual que la salinidad que reduce el transporte del agua y asimilación de nutrientes (16).

El medio de cultivo MS es considerado rico en sales (17), pues contiene altas concentraciones de iones amonio NH_4^+ (20.6 mM), iones nitrato NO_3^- (39.4 mM), iones cloro Cl^- (6.0 mM) y MoO_4^- (1.0 mM). Sin embargo, contiene concentraciones de Ca (3.0 mM), PO_4^- (1.3 mM), Mg^+ (1.5 mM) y Cu^{++} (0.1 mM) relativamente bajas, en comparación con otros medios de cultivo como el DKW (Driver-Kuniyuki Walnut) (18). Parada y Villegas (19) afirmaron que el CaCl_2 es considerado tóxico para especies leñosas, motivo por el cual reformularon el medio de cultivo WPM como WPMm, que carece de cloruro de calcio.

La adición de 2.0 mg L^{-1} de mio-inositol al medio de cultivo eliminó el agrandamiento de las hojas de los brotes *in vitro* formado. Al respecto, Sepahvand *et al.* (20) señalaron que en la etapa de establecimiento *in vitro* del pie de injerto GF677 [durazno (*Prunus persica* (L.) Stokes) × híbrido de almendro (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb)], hay un problema en el que las hojas se vuelven grandes y anchas, debido a las altas fuentes de carbono en las sales MS, que termina en brotes enanos y rosetones. La disminución de la concentración de mio-inositol de 100 mg L^{-1} a 10 mg L^{-1} dio como resultado un crecimiento normal de los brotes y una eliminación del agrandamiento anormal de las hojas. Los resultados de la presente investigación apoyan lo informado por estos autores.

Multiplicación *in vitro*

Los mejores resultados en esta fase de la propagación *in vitro* se obtuvieron con 0.5 mg L^{-1} de 6-BAP, sin la presencia de la auxina (ANA) en el medio de cultivo. Esto permitió un coeficiente de multiplicación de 5.25 nuevos brotes por explante sin la presencia de callo en la base de los brotes *in vitro* (tabla 3 y figura 1).

Tabla 3. Efecto de los reguladores del crecimiento 6 BAP y ANA en el medio de cultivo para la multiplicación *in vitro* de brotes de morera (*Morus alba* L.) cv. IZ 16/8 a los 30 días de cultivo

6 BAP (mg L^{-1})	ANA (mg L^{-1})	Floroglucinol (mg L^{-1})	Altura (cm)	Presencia de callo basal (%)	Numero de hojas	Coeficiente de multiplicación
0.5*	0.2	0.0	2.27 a	100	3.3 a	3.14 b
0.5	0.0	30.0	2.13 a	0.0	3.5 a	5.25 a
0.5	0.2	30.0	2.44 a	0.0	3.2 a	3.55 b
0.5	0.3	30.0	1.86 b	0.0	3.1 a	2.70 c

Medias con letras no comunes dentro de la misma columna difieren estadísticamente según prueba de Tukey para $p < 0,05$ ($n=60$) *Control.



Figura 1. Brotes *in vitro* de morera (*Morus alba* L.) cv. híbrido IZ 16/8, en medio de cultivo de multiplicación con 0.5 mg L^{-1} de 6-BAP + 30 mg L^{-1} de floriglucinol, a los 20 días de cultivo sin la presencia de callo basal.

Al respecto, Nuri (21) mostró que el papel de las citoquininas en la fase de multiplicación es importante para lograr la proliferación de las yemas axilares, a partir de la función determinante que desempeñan estas en el proceso de división celular. Esa misma respuesta la señalaron Habib *et al.* (22), Balakrishnan *et al.* (23), Vijayan *et al.* (24) y Pérez *et al.* (25), quienes indicaron que los mejores resultados en la multiplicación *in vitro* de morera los obtuvieron al utilizar 6-BAP en el medio de cultivo.

Los resultados alcanzados en esta fase son contrarios a los informados por Saha *et al.* (26), quienes alcanzaron los mayores coeficientes de multiplicación con la combinación de 6-BAP y ANA ($0.5 + 0.3 \text{ mg L}^{-1}$) en el cultivar de morera S-1. También, Salas (8) informó que los mayores coeficientes de multiplicación se obtuvieron con la combinación de 0.5 mg L^{-1} de 6-BAP y 0.5 mg L^{-1} de ANA en el cultivar Criolla.

Según Suresh y Ajay (27) estas diferencias indican una posible existencia de efectos del genotipo. Como está establecido en el cultivo *in vitro*, los requerimientos de reguladores del crecimiento exógeno dependen de los niveles endógenos de reguladores del crecimiento o fitohormonas en el tejido de las plantas. Esto varía con el tipo de órgano, genotipo y las fases del crecimiento.

La concentración de citoquininas con mayor coeficiente de multiplicación concuerda con lo informado por Viquez (12), que logró una mayor tasa de propagación de los explantes en el medio de cultivo suplementado, con la concentración de 6 BAP, mencionada anteriormente; este autor también informó que, a mayores concentraciones de esta citoquinina, se encontraron callos basales y, por ende, una menor tasa de multiplicación; en el presente trabajo no se formaron callos basales en los distintos tratamientos establecidos, debido a la utilización del floriglucinol en el medio de cultivo.

Enraizamiento *in vitro*

El mayor porcentaje de enraizamiento se alcanzó con la concentración de 0.5 mg L^{-1} de AIB en el medio de cultivo. Respecto a las variables relacionadas con el enraizamiento, se alcanzaron también los mayores valores en la longitud de la raíz y el número de raíces, en el tratamiento con 30 mg L^{-1} de floriglucinol en combinación con la auxina, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos evaluados (tabla 4 y figura 2).

Tabla 4. Efecto de la concentración del regulador del crecimiento ácido indol-butírico (AIB) sobre el enraizamiento y crecimiento de las plantas *in vitro* de morera (*Morus alba* L.) cultivar híbrido IZ-16/8 a los 30 días en medio de enraizamiento

Concentración de AIB (mg L ⁻¹)	Floroglucinol (mg L ⁻¹)	Altura (cm)	No. de hojas	Presencia de callo basal (%)	No. de raíces	Longitud raíz más larga (cm)	Enraizamiento (%)
0.0	30.0	3.86 c	6.3 a	0.0	3.7 b	3.56 b	53.0 b
0.50	30.0	5.19 a	6.9 a	0.0	5.1 a	3.71 a	85.0 a
0.75	30.0	4.53 b	5.7 a	0.0	5.4 a	2.31 c	45.0 c
1.00	30.0	4.76 b	6.0 a	0.0	5.7 a	2.33 c	41.0 c

Medias con letras no comunes dentro de la misma columna difieren estadísticamente según prueba de Tukey y de proporciones para el caso del porcentaje para $p < 0,05$ ($n=60$).



Figura 2. Planta *in vitro* de Morera (*Morus alba* L.) cv. híbrido IZ 16/8, enraizada en medio de cultivo, con 0.5 mg L⁻¹ de AIB y 30.0 mg L⁻¹ de floroglucinol, a los 30 días de cultivo.

El AIB (0.5 mg L⁻¹) combinado con el floroglucinol estimuló la elongación de los brotes y la formación de nuevas raíces, así como su longitud. Estos resultados constituyen el primer informe del uso del AIB más floroglucinol en el medio de cultivo para el enraizamiento *in vitro* de la morera cv. híbrido IZ 16/8, sin formación de callo basal.

También, autores como Balakrishnan *et al.* (23); Sajeevan *et al.* (28) y Saha *et al.* (26) comunicaron buenos resultados en el enraizamiento *in vitro* de brotes de morera, con el empleo de AIB, pero en concentración mayor (1.0 mg L⁻¹) a la de la presente investigación, con valores entre 82.0 y 89.3 %; sin embargo, estos autores no utilizaron en el medio de cultivo el floroglucinol, lo que puede explicar la necesidad de mayor concentración de la auxina, así como la no formación de raíces en el medio de cultivo sin la presencia del regulador del crecimiento.

Según De Klerk *et al.* (29), compuestos fenólicos tales como el floroglucinol, protegen la auxina (AIA) frente a la descarboxilación en brotes *in vitro* de manzano (*Malus domestica* Borkh). Varios investigadores informaron que el floroglucinol actúa sinérgicamente con la auxina, durante la sensible etapa de la iniciación de la raíz (30, 31). Los resultados alcanzados en la presente investigación demuestran un efecto sinérgico del floroglucinol con el AIA o protector de la auxina, además de corroborar los resultados informados por De Klerk *et al.* (29) y de Daud *et al.* (31).

Al respecto Aremu *et al.* (32) señalaron que los compuestos fenólicos protegen de la oxidación los reguladores del crecimiento de las plantas, especialmente las auxinas que ayudan a promover el desarrollo de las raíces. También, el efecto de estos ácidos fenólicos sobre el contenido endógeno de este regulador del crecimiento sigue siendo vital para comprender el mecanismo subyacente de

su acción. Además, de la forma activa del AIA, se observaron concentraciones variables de formas catabólicas y conjugadas en el cultivo *in vitro* de la orquídea (*Earina autumnalis* (G.Forst.) (Hook.f.)).

En general, este regulador del crecimiento ejerce una fuerte influencia en numerosas etapas fisiológicas vitales, en el ciclo de vida de una planta; además, mantiene niveles celulares apropiados de auxina activa, que son importantes para regular todos los aspectos de su crecimiento y desarrollo (33). También Ljung (34) señaló que los niveles de auxina celular dependen de la tasa de anabolismo, catabolismo, transporte y conjugación en un momento dado en un tejido.

Según el tipo y concentración, se sabe que los compuestos fenólicos inhiben o promueven el enraizamiento, mediado por su influencia sobre el metabolismo y la concentración de formas activas de auxinas en las plantas (35, 36, 29, 37). Asimismo, Gaspar *et al.* (38) demostraron que los inhibidores fenólicos de la AIA oxidasa, como el floroglucinol, aumentan la actividad de este regulador del crecimiento. Algunos de estos compuestos actúan como sustratos alternativos para la enzima oxidativa y, por tanto, protegen las auxinas de la degradación por esta enzima.

Los compuestos fenólicos pueden proteger a las auxinas de la descarboxilación, lo que aumenta la concentración de formas activas de auxina necesarias para estimular o inducir el enraizamiento; sin embargo, la efectividad de los compuestos fenólicos depende de factores como el número de grupos OH y su posición en el anillo aromático (36, 29, 39). Estas razones señaladas posiblemente explican la respuesta diferencial observada en el tratamiento sin auxina (AIB).

También, el floroglucinol se utilizó en otros cultivos para estimular o potenciar la acción de la auxina en el medio de cultivo. Al respecto, Daud *et al.* (31) informaron el uso de este compuesto fenólico combinado con el regulador del crecimiento tipo auxina AIB en la especie *Jatropha curcas* L. para obtener un alto porcentaje de enraizamiento (83 %) y un alto número de raíces por planta.

Al respecto, Romais *et al.* (40) señalaron que los compuestos fenólicos son esenciales para el control de varios procesos morfogénicos que ocurren *in vitro* e indicaron que el rol está aún lejos de comprenderse. Además, Husain *et al.* (41), para el enraizamiento de brotes *in vitro* de *Pterocarpus marsupium* Roxb emplearon en el medio de cultivo el floroglucinol y AIB e informaron una alta frecuencia de plantas con raíces (70 %) superior al control (50 %), así como un mayor número y largo de estas.

También Modgil *et al.* (42) señalaron que la concentración de 50 mg L⁻¹ de floroglucinol incrementó el porcentaje de enraizamiento en el manzano, de 63 a 93 %, en dependencia del cultivar. Además Sharma *et al.* (43), en este cultivo, pero en el portainjerto MM106, encontraron un mayor número de raíces por plantas en los tratamientos con floroglucinol.

Por su parte, Posada *et al.* (44) refirieron la adición de este nuevo regulador del crecimiento floroglucinol en el medio de cultivo para el enraizamiento de los brotes *in vitro*, de conjunto con la auxina AIB, en papaya (*Carica papaya* L. cv. Maradol Roja), este nuevo regulador estimuló el enraizamiento (100 %), ya que actuó en sinergismo con la auxina. Los resultados obtenidos en la presente investigación apoyan los informados por estos autores.

Según Custodio *et al.* (45) el enraizamiento es una fase difícil durante la propagación *in vitro* de muchas especies; sin embargo, Ahmad *et al.* (46) y Custodio *et al.* (45) señalaron que tener la mayor cantidad de plantas *in vitro* con raíces es un aspecto importante para aumentar la supervivencia y el crecimiento durante la aclimatización *ex vitro* y que las pérdidas en esta fase tienen, desde el punto de vista práctico, un valor económico.

La figura 3 muestra un grupo de plantas *in vitro* de cv. híbrido, obtenidas por el protocolo desarrollado, luego de pasar por la fase de aclimatización, con una supervivencia del 94.6 %, listas para su plantación en el campo.



Figura 3. Aspecto de las plantas *in vitro* de Morera (*Morus alba* L.) cv. híbrido IZ 16/8, después de pasar por el proceso de aclimatización y listas para plantación en campo.

CONCLUSIONES

1. Se logra el establecimiento *in vitro* de yemas axilares del cultivar híbrido IZ 16/8, con el uso de plantas madre de morera, cultivadas en condiciones semicontroladas, bajo 50 % de sombra y la aplicación de pretratamientos previos a la toma del material vegetal inicial. Como parte del proceso de desinfección de los explantes, el empleo de hipoclorito de sodio al 1.0 %, durante 25 min, resulta el más efectivo.
2. La mejor concentración de citoquinina, para la fase de multiplicación del cultivar híbrido IZ 16/8 es 0.5 mg L⁻¹. En ningún caso existe presencia de callo basal en los brotes *in vitro*, debido a la adición del floriglucinol en los medios de cultivo.
3. Se alcanzó un 85.0 % de enraizamiento de los brotes *in vitro* de morera (*Morus alba* L.) cv. híbrido IZ 16/8, con el empleo combinado de la auxina AIB, a una concentración de 0.5 mg L⁻¹ y 30.0 mg L⁻¹ de floriglucinol.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martín, G.J.; *et al.* Estudios agronómicos realizados en Cuba en *Morus alba*. *Pastos y Forrajes* 23 (3):20-23. 2000.
2. ONEI. Agricultura, Ganadería, Silvicultura y Pesca. En: Anuario 2020 de la Oficina Nacional de Estadísticas e Información de la República de Cuba. Capítulo 9. 35p. <http://onei.gob.cu>. 2021.
3. Martín, G.J.; *et al.* La morera (*Morus alba*, L.): una especie de interés para la alimentación animal. *Pastos y Forrajes* 30 supl.5:25-32. 2007.
4. Peters, M.; Franco, L.H.; Schmidt, A. Especies forrajeras multipropósito. En: http://isa.ciat.cgiar.org/catalogo/listado_es.jsp?pager.offset=25&tema-forrajes. Consultado 02/05/2023. 2003.

5. Thorpe, T. History of Plant Tissue Culture. Methods in Molecular Biology, En: Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota F (Eds) Plant Cell Culture Protocols, Second Edition, Totowa, 411 pp. 2014.
6. Murashige, T.; Skoog, F.A. Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco-Tissue Cultures. *Physiologia plantarum* 15:473-497.1962.
7. Heinz, D.J.; Mee, G.W.P. Plant differentiation from callus tissue of *Sacharum* species . *Crop Science* 9:346-348. 1969.
8. Salas, J.; *et al.* Propagación de plantas de *Morus alba* var. Criolla con el uso de sistemas de inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal*. 11(2):77-88. 2011.
9. Guevara, L.; *et al.* Establecimiento *in vitro* del portainjertos híbrido 'Garfi x Nemared' para durazno. *Biotecnología Vegetal* 16(2):73-82. 2016.
10. Cassells, A.C. Pathogen and Biological Contamination Management in Plant Tissue Culture: phytopathogens, *vitro* pathogens, and *vitro* pests. En: Loyola-Vargas V, Ochoa Alejo N (eds). *Plant Cell Culture Protocols Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 877, pp. 57-80. Humana Press, Totowa. 2012. doi: 10.1007/978-1-61779-818-4_6.
11. Battistini, A.; De Paoli, G. Large scale micropropagation of several peach rootstocks. *Acta Horticultural*.592:29-33. 2007.
12. Viquez, P. Establecimiento de un protocolo de propagación *in vitro* de morera (*Morus* sp.) para el suministro de material de siembra en la cadena serícola en el departamento del Cauca-Colombia. Tesis de Maestría. Palmira, Colombia: Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. 65 p. 2018.
13. Morard, P.; Henrym, M. Optimization of the mineral composition of *in vitro* culture media. *Journal of Plant Nutrition* 21:565-1576.1998.
14. Pierik, R.L.M. Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 p. 1990.
15. Larqué-Saavedra, A.; Trejo, C. El Agua en las Plantas. Ed. Trillas. México. 88 p. 1990.
16. Silva, M.C.; *et al.* Efecto del potencial osmótico y contenido de Ca en el medio de cultivo sobre la distribución de Ca^{2+} K^{+} , producción de biomasa y necrosis apical de vid *R110* . *Interciencia* 29:384-388. 2004.
17. Cassells, A.; Curry, R. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 64:145-157. 2001.
18. George, E.F.; Hall, M.A.; De Klerk, G. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer. The Netherlands. 479 p. 2008.
19. Parada, D.P.; Villegas, M.A. Propagación *in vitro* del híbrido almendro x durazno H1. *Rev. Fitotec. Mex.* 32 (2): 103-109. 2009.
20. Sepahvand, S.; *et al.* Effects of myo-Inositol and thiamine on Micropropagation of GF677 (Peach x Almod Hybrib). *Journal of Agricultural Science*. 4 (2): 2012.
21. Nuri M, Bolek Y, Sevgin N. The effects of explant and cytokinin type on regeneration of *Prunus macrocarpa*. *Scientia Horticulturae* 126:88-94. 2010.
22. Habib, A.; *et al.* Clonal propagation of white mulberry (*Morus alba* L.) using *in vitro* technique. *Journal of Biotechnological Sciences*. 3(12):1181-1187. 2003.
23. Balakrishnan, V.; *et al.* Clonal propagation of *Morus alba* L. through nodal and axillary bud explants. *Bot. Res. Int.* 2: 42–49. 2009.
24. Vijayan, K.; *et al.* Biotechnology of mulberry (*Morus* L.). A review. *Emir. J. Food Agric.* 26 (6):472-496. 2014.
25. Pérez-Pérez, J.L.; *et al.* *In vitro* multiplication of *Morus alba* L. Criolla variety in temporary immersion system. *Pastos y Forrajes* 43 (3):221-229. 2020.

26. Saha, S.; *et al.* Improvement of embryo rescue technique using 4-chloroindole-3 acetic acid in combination with in vivo grafting to overcome barriers in lentil interspecific crosses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120:1109-1116. 2015.
27. Suresh, C.; Ajay, K.S. In vitro shoot regeneration from cotyledonary node explants of a multipurpose leguminous tree *Pterocarpus Marsupium* Roxb. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 40:167-170. 2004.
28. Sajeevan, R.S.; *et al.* An efficient *in vitro* protocol for multiple shoot induction in mulberry, *Morus alba* L. variety V1. *Int. Res. J. Plant Sci.* 2:254–261. 2011.
29. De Klerk, G.J.; *et al.* Effects of phenolic compounds on adventitious root formation and oxidative decarboxylation of applied indoleacetic acid in *Malus Jork 9*. *Plant Growth Regul* 63:175-185. 2011.
30. Dobránszki, J.; Teixeira da Silva, J.Á. Micropropagation of apple-a review. *Biotechnol Adv* 28:301-322. 2010.
31. Daud, N.; Faizal, A.; Green, D. Adventitious rooting of *Jatropha curcas* L. is stimulated by phloroglucinol and by red LED light. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 49:183-190. 2013.
32. Aremu, A.O.; *et al.* Physiological role of phenolic biostimulants isolated from brown seaweed *Ecklonia maxima* on plant growth and development. *Planta* (2015) 241:1313–1324. 2015. doi: 10.1007/s00425-015-2256-x
33. Korasick, D.A.; Enders, T.A.; Strader, L.C. Auxin biosynthesis and storage forms. *J Exp Bot* 64:2541–2555. 2013.
34. Jung, K. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140:943–950. 2013.
35. Peer, W.A.; Murphy, A.S. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends Plant Sci* 12:556-563. 2007.
36. Wu, H.C.; *et al.* The phenolic, 3,4-dihydroxybenzoic acid, is an endogenous regulator of rooting in *Protea cynaroides*. *Plant Growth Regul* 52:207–215. 2007.
37. Teixeira da Silva, J.A.; Dobránszki, J.; Ross, S. Phloroglucinol in plant tissue culture. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 49:1-16. 2013.
38. Gaspar, T.; *et al.* Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 32:272–289. 1996.
39. Gülçin, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol* 86:345–391. 2012.
40. Romais, E.; *et al.* Efeito do Floriglucinol na reação morfogênica *in vitro* de segmentos internodais de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv Pera. *Rev. Ceres* 47:113-120. 2000.
41. Husain, M.K.; Anis, M.; Shahzad, A. *In vitro* propagation of a multipurpose leguminous tree (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using nodal explants. *Acta Physiol Plant* 30:353-359. 2008.
42. Modgil, M.; Sharma, D.R.; Bhardwaj, S.V. Micropropagation of apple cv. Tydemann Early Worcester. *Sci. Hortic.* 81: 179-188. 1999.
43. Sharma, M.; Modgil, M.; Sharma, D.R. Successful propagation in vitro of apple rootstock MM106 and influence of phloroglucinol. *Indian J. Exp Bot* 38:1236-1240. 2000.
44. Posada-Pérez, L.; *et al.* Effect of phloroglucinol on rooting and *in vitro* acclimatization of papaya (*Carica papaya* L. var. Maradol Roja) *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 52:196–203. 2016.
45. Custodio, L.; Martins-Loucao, M.; Romano, A. Influence of sugars on *in vitro* rooting and acclimatization of carob tree. *Biol Plant* 48 (3):469-472. 2004.
46. Ahmad, T.; *et al.* Effect of culture media and growth regulators on micropropagation of peach rootstock GF 677. *Pak Journal Botany* 35 (3):331-338. 2003.