



## Crecimiento in vitro de *Nephrolepis cordifolia* (L.) Presl.

Lourdes Díaz Canals, Esperanza Peña García y Emma Grillo Mensa. Laboratorio de Fisiología Vegetal, Jardín Botánico Nacional

### RESUMEN

Se estudió la influencia de diferentes medios nutritivos en el crecimiento "in vitro" de la región apical del rizoma de *Nephrolepis cordifolia* (L.) Presl. Se utilizaron seis variantes diferentes y después de 25 días en cultivo se lograron distintos efectos en relación con la composición del medio empleado. Se discuten los resultados.

### ABSTRACT

The influence of different nutrient media on apical region of the rhizome of *Nephrolepis cordifolia* (L.) Presl. was studied. Six different combinations were used, and often 25 days in culture, distinct responses were obtained in relation with the composition of the employed medium. Results are discussed.

### INTRODUCCIÓN

Los distintos géneros de muchos helechos actuales son codiciados no sólo por su alto valor ornamental, sino además por las variadas condiciones

ecológicas en que habitan, así como la posibilidad de su reproducción artificial, lo que permite su cultivo con facilidad.

Los métodos tradicionales para su propagación son muy conocidos y permiten lograr un adecuado número de plantas, por la división de cepas, la separación de los rizomas arraigados, la separación de bulbillos y las esporas que se producen en el envés de las hojas. Las empresas relacionadas con la producción masiva de plantas emplean actualmente estos métodos.

Sin embargo, en la actualidad la práctica del cultivo "in vitro" para la propagación masiva de muchas especies de interés se ha convertido en el método más ventajoso para el logro de estos objetivos. Existen numerosos trabajos en que se reportan medios nutritivos, requerimientos hormonales y su influencia en la morfogénesis, el efecto de los azúcares en algunas especies de helechos (Steeves y Sussex, 1957; Sussex y Cutter, 1960; Hicks y Steeves, 1969; Hirsch, 1975; Kshirsagar y Metita, 1978; Loescher y Albrecht, 1979; Beck y Caponetti, 1983; Chen, Read y Hall, 1985; Caponetti y Byrne, 1985) inclusive se ha llegado a probar las técnicas de injertos "in vitro" (Hicks, Steeves y Sweeny, 1967). En estos trabajos se han utilizado también diferentes fuentes de explantes como rizomas, ápices, hojas y protalos.

Basado en la experiencia acumulada, en el presente trabajo se reportan los resultados obtenidos de cultivar durante 25 días las regiones apicales del rizoma de *Nephrolepis cordifolia* (L.) Presl. en distintos medios de cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron como fuente de explante la región apical de rizomas de *Nephrolepis cordifolia* (L.) Presl. de plantas cultivadas en el Jardín Botánico Nacional. Los segmentos aplicales de 1 a 2 mm de diámetro y de 15 mm de longitud se esterilizaron en legía comercial al 50% durante cinco minutos, se lavaron posteriormente con agua estéril varias veces y luego se sembraron en los diferentes medios nutritivos que aparecen a continuación:

- I - Gamborg et al (1968)
- II - Gamborg et al (1968) suplementado con Agua de Coco al 10%.
- III - Gamborg et al (1968) sin microelementos.
- IV - Knudson (1922)
- V - Knudson (1922) suplementado con Agua de Coco al 10%
- VI - Agua de Coco al 10%.

Los explantes se mantuvieron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura y luz artificial difusa de baja intensidad durante 14 horas diarias alternando con periodos de oscuridad de 10 horas.

Se realizó la evaluación a los 25 días de desarrollo de los explantes; teniendo en cuenta para esto los siguientes caracteres:

- a) Incremento en diámetro del extremo apical.
- b) Incremento en longitud.
- c) Neoformación de yemas.
- d) Neoformación de rizomas.
- e) Desarrollo de frondes.
- f) Color de la región neoformada a partir del ápice del explante a los 25 días.
- g) Color del explante original a los 25 días.

Para la evaluación de los caracteres referidos se utilizaron diferentes rangos, cuyas codificaciones se presentan a continuación:

- a) Incremento en diámetro: se tomaron en consideración las mediciones del diámetro perpendicular al eje mayor del explante en el extremo apical por ser la única región donde se produce un incremento.
  - 1- 0-2,0 mm: respuesta negativa o no evidente (se incluyen en este rango desde los explantes que puedan haber disminuido su diámetro inicial por deshidratación hasta aquellos que pudieran haberlo incrementado ligeramente en las primeras horas de cultivo sin que pudiera considerarse el resultado de la acción del medio de cultivo).
  - 2- 2.1-4,0 mm: incremento medio (se incluyen los explantes que llegaron a duplicar su diámetro en 25 días como resultado del tratamiento).
  - 3- 4.1-6,0 mm: incremento considerable (se incluyen los explantes que llegaron a triplicar el diámetro inicial en 25 días).
- b) Incremento en longitud:
  - 1- 0-20 mm: Respuesta negativa o no evidente (teniendo en consideración los mismos aspectos que para el diámetro).
  - 2- 21-40 mm: incremento medio (teniendo en consideración los mismos aspectos que para el diámetro).
  - 3- 41-60 mm: incremento considerable (teniendo en cuenta los mismos aspectos que para el diámetro).
- c) Neoformación de yemas: se expresan la ausencia de yemas (0) y el número de yemas neoformadas en la región apical a los 25 días (1-4 yemas).
- d) Neoformación de rizomas: se expresan la ausencia de rizomas (0) y el número de rizomas neoformadas a los 25 días de desarrollo del explante (1-3 rizomas).
- e) Desarrollo de frondes: se establecieron tres grupos:
  - 0- Representa la ausencia de primordios o frondes en sus primeros estadios de desarrollo.

- 1- Representa el número de explantes en los que se alcanzó hasta la formación de los primordios foliares (entre 2 y 5 mm de longitud).
  - 2- Representa el número de explantes en que se alcanzó hasta la neoformación de frondes en sus primeros estadios de desarrollo (entre 6 y 10 mm de longitud).
- f) Color de la región neoformada a partir del ápice del explante a los 25 días.
- 1- negruzco verdoso.
  - 2- amarillo verdoso.
  - 3- verde claro.
  - 4- verde brillante.
- g) Color del explante original a los 25 días.
- 1- pardo oscuro
  - 2- pardo claro
  - 3- verde claro
  - 4- verde brillante

## RESULTADOS

El incremento en el diámetro del extremo apical de los rizomas de la especie en estudio en los diferentes medios de cultivo después de 25 días refleja el efecto de cada tratamiento sobre la actividad de los meristemos apicales y se presenta en la tabla I.

De acuerdo con la escala establecida para la evaluación de este carácter se hace evidente que cualquiera de ellos promueve esta actividad, aunque el medio mineral de Knudson suplementado con agua de coco al 10% (tratamiento V) resulta el mejor teniendo en cuenta lo generalizado de la respuesta y la homogeneidad en el incremento de diámetro alcanzado donde se reflejan valores en que se triplican los valores iniciales del diámetro del explante. En la figura 1 se observa este efecto.

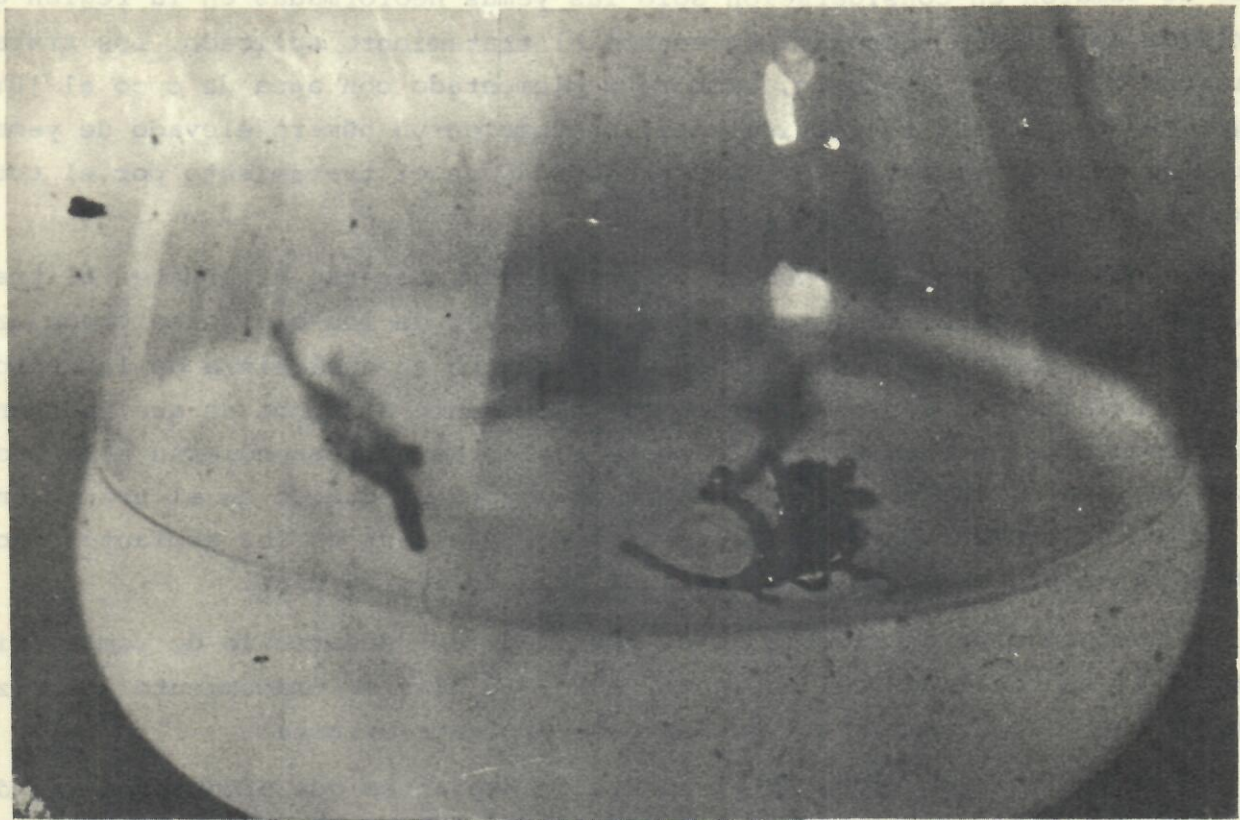


Figura 1. Crecimiento en longitud y espesor del extremo apical de *Nephrolepis cordifolia* en el medio Knudson suplementado con agua de coco al 10% a los 25 días. Se observa además los rizomas y frondes producidos.

Aunque las respuestas en los tratamientos I y II no alcanzan la homogeneidad del tratamiento V, estos también promueven altamente la actividad meristemática.

En la tabla II se refleja el incremento en la longitud de los rizomas en el momento de la evaluación, así como los valores absolutos menor y mayor alcanzados en cada uno de los grupos establecidos. Resulta importante destacar que en ninguno de los casos se alcanzan valores entre 40 y 60 mm de incremento en la longitud del explante original. Más aún, los valores en la longitud de los explantes agrupados en la segunda clase se aproximan mucho al límite inferior de esta, en que el máximo valor alcanzado resulta de 22 mm y representa un incremento aproximado de 7 mm. No obstante, en los tratamientos I y V (Gamborg y Knudson suplementado con agua de coco al 10%) existe un efecto promotor del crecimiento en longitud. La totalidad de los explantes sometidos al tratamiento V alcanzan valores entre 20 y 22 mm mientras que en el tratamiento I la variabilidad en la respuesta es mayor. La figura anterior también evidencia este efecto.

La producción de yemas en 25 días fue evaluada para conocer el efecto que pudieran ejercer los distintos tratamientos, aunque es evidente que este parámetro se relaciona con el patrón de crecimiento del helecho. Es por ello,

que se tomaron en consideración sólo las yemas neoformadas en la región del extremo apical que responde por entero al tratamiento aplicado. Los tratamientos I, II y VI (Gamborg, Gamborg suplementado con agua de coco al 10% y agua de coco al 10% respectivamente) produjeron un número elevado de yemas, si se considera el total de yemas producidas en el tratamiento por el total de explantes.

Sin embargo, aunque en número no pueden considerarse diferentes el tratamiento II resulta el más efectivo ya que el 90% de los explantes produjeron entre 3 y 4 yemas a diferencia de lo que ocurre en cualquiera de los otros medios utilizados. Por otra parte, es interesante el hecho de que independientemente del tratamiento sólo siete explantes no respondieron a la producción de yemas. Finalmente, es notable el efecto producido en el tratamiento V ya que la producción de yemas es la menor y el 60% de los explantes no responden o presentan sólo una yema al cabo de los 25 días.

La neoformación de rizomas es el resultado del desarrollo de yemas existentes en la totalidad del explante. A los 25 días de tratamiento los rizomas crecen sólo a partir del segmento de explante original.

En la tabla IV se presenta el número de explantes que produjeron las distintas cantidades de rizomas por tratamiento. Aunque en general existe una dispersión grande en la respuesta, el tratamiento V (Knudson suplementado con agua de coco al 10%) produce entre 1 y 2 rizomas a los 25 días en el 90% de los explantes.

La producción de frondes y su crecimiento también fueron evaluados. En la tabla V se refleja el número de explantes en que no hubo respuesta en el desarrollo de frondes (0), donde la mejor respuesta fue el desarrollo de primordios foliares (1) así como el número de explantes en los cuales se alcanzó el desarrollo de hojas (2). Se evidencia que el medio mineral de Knudson suplementado o no con agua de coco influye favorablemente en la producción de hojas; que el medio de Gamborg sin microelementos y el agua de coco al 10% ejercen un efecto negativo en el desarrollo de primordios y frondes; y que en los medios de Gamborg suplementado o no, con agua de coco al 10%, no hay una respuesta evidente al tratamiento por la variabilidad del desarrollo alcanzado en los explantes. En la figura 2 se observa el desarrollo de frondes en los explantes sometidos a los tratamientos de Knudson y Knudson suplementado con agua de coco al 10%.

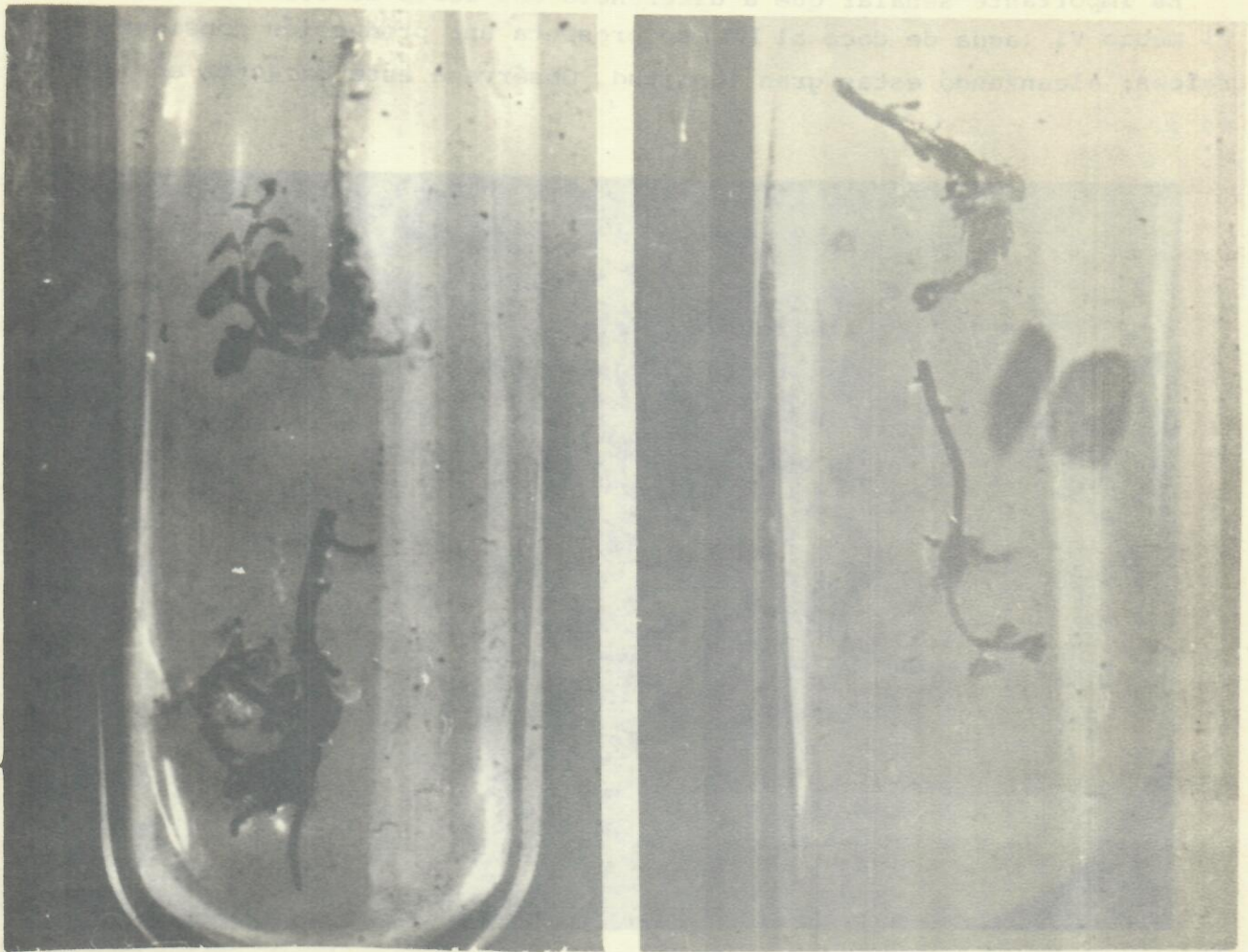


Figura 2. Desarrollo de frondes de *Nephrolepis cordifolia* a los 25 días en cultivo. A. Frondes desarrollados en el medio de Knudson suplementado con agua de coco al 10%. B. Explante desarrollado en el medio Knudson.

La evaluación de la coloración que toman los explantes después de 25 días de cultivo en los diferentes medios se realizó separadamente en el explante original y en la región neoformada a partir de su extremo apical.

En la tabla VI se representa el número de explantes que tomaron las distintas coloraciones en los distintos medios de cultivo, es evidente que el tratamiento tiene un efecto directo sobre la coloración de la región neoformada ya que en general todos los explantes se comportan de la misma forma y en el caso en que esto no sucede existe una concentración del 80% de los valores.

Los tratamientos V y VI resultan los mejores, teniendo en cuenta la coloración de los rizomas en condiciones naturales.

En la tabla VII, en que se analiza el mismo parámetro en la región complementaria, los tratamientos V y VI resultan los más adecuados por cuanto mantienen la coloración del explante recién sembrado en la totalidad de los casos.

Es importante señalar que a diferencia del resto de los tratamientos en el medio VI (agua de coco al 10%) se presenta una producción considerable de raíces; alcanzando estas gran longitud. Obsérvese este carácter en la Figura 3.

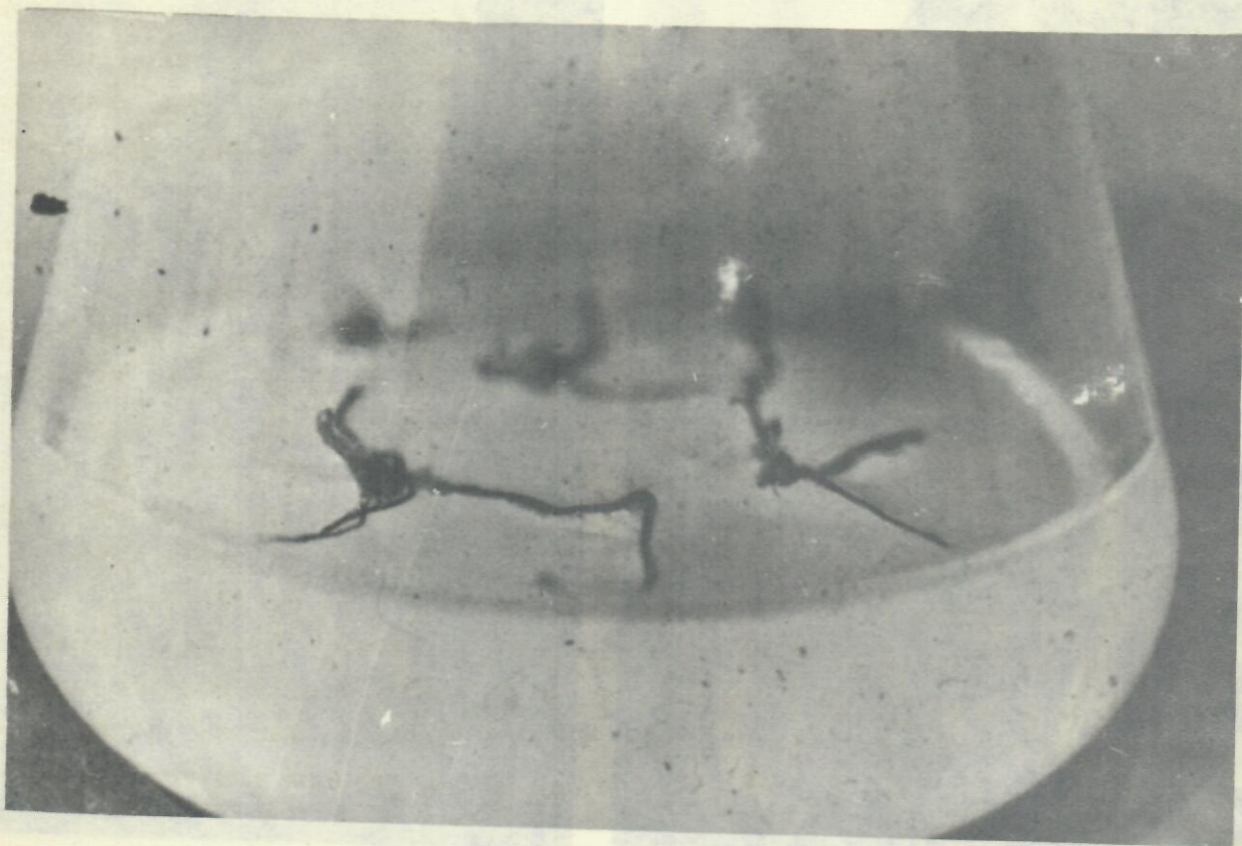


Figura 3. Desarrollo de raíces de *Nephrolepis cordifolia* después de 25 días de cultivo en medio de Agua de Coco al 10 % (tratamiento VI).

## DISCUSIÓN

Los resultados de cultivar regiones jóvenes de rizomas de *Nephrolepis cordifolia* (L) Presl. demuestran la posibilidad de propagar esta especie, utilizando los mismos como fuente de explantes. Aunque no es primera vez que se utilizan fragmentos de rizomas con estos fines ya que existen publicaciones y trabajos presentados en eventos que así lo manifiestan (Hicks y Steeves, 1969; Kshirsagar y Metita, 1978; Caponetti y Byrne, 1985; Chen, Read y Hall, 1985), nunca antes se había probado en Cuba en la especie objeto de estudio.

A los 25 días de sembrados los explantes, existen un conjunto de aspectos relacionados al patrón morfogénético que permiten evaluar los distintos medios de cultivo empleados para los objetivos propuestos.

En primer lugar es importante destacar que el incremento en el diámetro de los explantes en los tratamientos, I, II y V se estimulan en gran medida, esto se evidencia porque en el 100% (tratamiento V) o en el 80% (tratamien-

to I y II) los valores iniciales del explante se triplican en 25 días. A diferencia de esto, el crecimiento en longitud no parece notable, sin embargo, es de destacar que la observación del patrón de crecimiento de los explantes evidencia que la respuesta sólo ocurre en el extremo apical.

Si se tiene en cuenta lo anterior en el análisis de los resultados un incremento del ápice que oscile entre 5 y 7 mm de longitud resulta notable para el tiempo en que ha ocurrido el crecimiento "in vitro" en el tratamiento V ya que la aparente "no respuesta" del 50% de los explantes coinciden en valor con el límite superior de grupo establecido.

Esta interpretación no tiene el mismo valor si se analiza el tratamiento I, ya que los cuatro explantes que aparentemente no responden tienen gran variabilidad en los valores de incremento y por lo tanto en algunos de ellos realmente no hubo una respuesta al crecimiento en longitud. Todo lo anterior, hace del medio Knudson suplementado con agua de coco al 10% el más adecuado para promover un crecimiento homogéneo de forma acelerada. Si a esto se añade que en el tratamiento V existe la mayor homogeneidad en la producción de rizomas a los 25 días (1 ó 2 rizomas), que ocurre en este tiempo la diferenciación hasta la formación de frondes en el 80% de los casos, existiendo también primordios foliares en todos los casos y que la coloración de los explantes es la más adecuada cuando se considera la porción original y la neoformada, resulta evidente que la obtención de plantas jóvenes de *Nephrolepis cordifolia* es posible en el medio de Knudson suplementado con agua de coco al 10%.

Del análisis de los resultados puede inferirse que el cultivo de fragmentos de rizomas en agua de coco por un período corto de tiempo, conllevaría a la producción acelerada de plantas implantadas en un alto por ciento.

El trasplante de estas al medio de Knudson suplementado con agua de coco al 10%, tratamiento de respuesta satisfactoria en la producción acelerada de rizomas, sería mucho más eficiente en número y tiempo para su producción. Inclusive, puede pensarse en el trasplante a tierra en fases tempranas sólo con un tratamiento de rizomas provenientes de medio de agua de coco.

Finalmente las condiciones de cultivo en que se llevó a cabo el presente estudio evidencia que la iluminación y temperatura empleadas no fueron causa en la obtención de respuestas adecuadas a los propósitos del trabajo; no obstante, teniendo en cuenta datos de estudio en que se analiza la influencia de estas condiciones en el cultivo "in vitro" de helechos (Chen, Read y Hall 1985) pudieran quizás incrementar el valor de los resultados obtenidos por nosotros.

Tabla I. Incremento en el diámetro del extremo apical de rizomas de *Nephrolepis cordifolia* en distintos medios de cultivo después de 25 días. Tratamientos: I, II, III, IV, V y VI; índice de crecimiento: 1, 2 y 3; número de explantes, No Exp; valor máximo del explante por tratamiento en mm, VM; valor mínimo del diámetro del explante por tratamiento en mm, vm.

Crecimiento en diámetro	Tratamiento	Tratamiento					
		I	II	III	IV	V	VI
1	No. Exp.	0	0	1	0	0	1
	vm	-	-	1.5	-	-	1.5
	VM	-	-	1.5	-	-	1.5
2	No. Exp.	2	2	9	9	0	9
	vm	3.0	3.0	3.0	3.0	-	3.0
	VM	3.0	3.5	3.5	3.5	-	3.5
3	No. Exp.	8	8	0	1	10	0
	vm	5	5	-	5	5	-
	VM	6	6	-	5	6	-

Tabla III. Neoforración de yemas en *Nephrolepis cordifolia* en diferentes medios de cultivo. Tratamientos: I, II, III, IV, V y VI; ausencia de yemas: 0; número de yemas formadas a los 25 días de cultivo en cada medio: 1, 2, 3 y 4.

Tabla II. Incremento en la longitud de rizomas de *Nephrolepis cordifolia* en diferentes medios de cultivo después de 25 días. Tratamientos: I, II, III, IV, V y VI; índice de crecimiento: 1, 2 y 3; número de explantes, No. Exp; valor máximo del explante por tratamiento en mm, VM; valor mínimo de la longitud del explante por tratamiento en mm, vm.

Incremento en longitud		Tratamiento					
		I	II	III	IV	V	VI
1	No. Exp.	4	7	10	10	5	9
	vm	16	16	15	16	20	15
	VM	20	20	18	18	20	20
2	No. Exp.	6	3	0	0	5	1
	vm	21	21	-	-	21	21
	VM	22	22	-	-	22	21
3	No. Exp.	0	0	0	0	0	0
	vm	-	-	-	-	-	-
	VM	-	-	-	-	-	-

Tabla III. Neoformación de yemas en *Nephrolepis cordifolia* en diferentes medio de cultivo. Tratamientos, I, II, III, IV, V y VI; ausencia de yemas, 0; número de yemas formadas a los 25 días de cultivo en cada medio 1,2,3 y 4.

No. de yemas \ Tratamientos	Tratamientos					
	I	II	III	IV	V	VI
0	0	1	1	2	3	0
1	1	0	2	3	3	2
2	2	0	2	2	2	1
3	1	3	3	2	2	1
4	6	6	2	1	0	6

Tabla IV. Neoformación de rizomas de *Nephrolepis cordifolia* en diferentes medios de cultivo. Los valores representan el número de explantes por tratamientos separados de acuerdo con los rizomas producidos. Tratamientos, I, II, III, IV, V y VI; número de rizomas formados a los 25 días, 1,2,3.

No. de rizomas \ Tratamientos	Tratamientos					
	I	II	III	IV	V	VI
0	4	2	5	2	1	10
1	1	5	2	4	4	0
2	2	2	2	2	5	0
3	3	1	1	2	0	0

Tabla V. Desarrollo de frondes de *Nephrolepis cordifolia* en diferentes medios de cultivo. Tratamientos; I, II, III, IV, V y VI; ausencia de primordios y frondes después de 25 días de cultivo; 0; primordios foliares (entre 2 y 5 mm de longitud), 1; primeros estadios de desarrollo del fronde (entre 6 y 10 mm de longitud), 2.

Des. frondes	Tratamientos					
	I	II	III	IV	V	VI
0	3	1	9	0	0	10
1	1	6	1	2	2	0
2	6	3	0	8	8	0

Tabla VI. Color de la región neoformada a partir del ápice del explante a los 25 días de *Nephrolepis cordifolia* en diferentes medios de cultivo. Tratamientos, I, II, III, IV, V y VI; negruzco verdoso, 1; amarillo verdoso, 2; verde claro; 3; verde brillante, 4.

Color de Región Neof.	Tratamientos					
	I	II	III	IV	V	VI
1	10	8	0	0	0	0
2	0	2	10	8	0	0
3	0	0	0	0	0	10
4	0	0	0	2	10	0

Tabla VII. Color del explante original de *Nephrolepis cordifolia* a los 25 días en diferentes medios de cultivo. Tratamientos, I,II, III, IV, V, y VI: pardo oscuro, 1; pardo claro, 2; verde claro, 3; verde brillante, 4.

Color del explante original \ Tratamientos	Tratamientos					
	I	II	III	IV	V	VI
1	8	2	0	8	0	0
2	0	7	10	2	0	0
3	2	1	0	0	0	10
4	0	0	0	0	10	0

#### BIBLIOGRAFÍA

- Beck, Michael J. and James D.Caponetti (1983)  
The effect of kinetin and naphthaleneacetic acid on in vitro shoot multiplication and rooting in the fishtail fern (*Nephrolepis falcata* f. *furcans*). Am Journal of Botany 70 (1): 1-7.
- Caponetti, James D. and Thomas E.Byrne (1985)  
Morphogenesis in Boston ferns by tissue culture in Abstracts Botanical Society of America. Am. Journal of Botany 72(6): 920.
- Chen, Shirmy Y.; Paul E.Read, and John W.Hall (1985)  
Influence of light, kinetin, 2,4-D and physical treatment on *Rumohra adiantiformis* rhizome tips cultured in vitro in Abstracts Botanical Society of America. Am Journal of Botany 72 (6): 921.
- Gamborg, O.L.; R.A.Miller and K.Ojima (1968)  
Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. cell. Res. 50: 151-158.
- Hicks, G.S. and T.A.Steeves (1969)  
In vitro morphogenesis in *Osmunda cinnamomea*. The role of the shoot apex in early leaf development. Canadian Journal of Botany 47 (4): 575-580.

- Hicks, G.S.; T.A.Steeves and P.R.Sweeny (1967)  
 A method for grafting fern leaf primordia in vitro. Canadian Journal of Botany 45: 2232-2236.
- Hirsch, Ann M. (1975)  
 The effect of sucrose on the differentiation of excised fern leaf tissue in to either gametophytes or sporophytes. Plan Physiol. 56(3): 390-393.
- Kshirsagar, M.K. and Metita (1978)  
 In vitro studies in ferns: Growth and differentiation in rhizome callus of *Pteris vittata*. Phytomorphology 28 (1): 50-58.
- Knudson, L. (1922)  
 Non simbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz. 73 (1): 1-25.
- Loescher, Wayne and Carolyn N.Albrecht (1979)  
 Development in vitro of *Nephrolepis exaltata* cultivar *Bostoniensis* runner tissues. Physiol. Plant 47(4): 250-254.
- Steeves, T.A. & I.M.Sussex (1957)  
 Studies on the development of excised leaves in sterile culture. Am. Journal of Botany. 44: 665-673.
- Sussex, Ian M. & Mary E.Clutter (1960)  
 A study of the effect of externally supplied sucrose on the morphology of excised fern leaves in vitro, Phytomorphology 10 (1): 87-99.

Recibido: 16 de julio de 1986.