



Cultivo in vitro de *Nephrolepis hirsutula* (Forster) Presl cv Duffii en el Jardín Botánico Nacional de Cuba

Lourdes Díaz Canals, Esperanza Peña García y Zoraida Torriente Campos
Jardín Botánico Nacional

RESUMEN

Se reportan los resultados de la influencia del medio mineral Gamborg, y de la aplicación del agua de coco y la Kinetina como suplementos en el desarrollo in vitro de plantas jóvenes de *Nephrolepis hirsutula* (Forster) Presl cv Duffii. Se discuten los resultados.

ABSTRACT

Results on the influence of Gamborg's mineral medium and of applying coconut milk and Kinetin as supplements for the development of young plants of *Nephrolepis hirsutula* (Forster) Presl cv Duffii are reported. Results are discussed.

INTRODUCCION

El cultivo in vitro constituye actualmente una tecnología importante a nivel mundial con fines comerciales, destacándose la producción de plantas ornamentales por esta vía, y dentro de estas los helechos por su gran demanda en el mercado. Sumado a la propagación por fragmentación, un método muy utilizado para propagar estas plantas es a través del cultivo in vitro de sus esporas (Hurel-Py 1945; 1951; Faiure-Barón 1980; White 1969, Edwards 1977; Furuya, Kadota and Vematsu-Kaneda 1982; Paless, Vida and Nagy 1984, Laird and Sheffield 1986), las que pueden obtenerse de la misma planta o de comercios que se ocupan de esta especialidad (Mejía, 1985). Sin embargo; una técnica muy utilizada actualmente con fines económicos que demuestran

la posibilidad con éxito de su propagación, es a través del desarrollo de rizomas de estas plantas cultivadas *in vitro* (Kshirsagar and Mehta, 1978; Loescher and Albrecht 1979; Beck and Caponetti 1983; Chen and Read 1983; Richards, Beck and Hirsch 1983; Caponetti and Byrne 1985; Chen, Read and Hall, 1985; Dykeman and Cumming 1985).

El género *Nephrolepis* constituye entre los helechos uno de los grupos de mayor cantidad de especies y variedades utilizadas como ornamental en Cuba. Su propagación se realizaba sólo por métodos tradicionales hasta hace unos años.

La propagación de *Nephrolepis cordifolia* (L.) Presl. a partir del cultivo *in vitro* de sus rizomas se logró masiva y aceleradamente (Díaz, Peña y Grillo, 1987).

En el presente trabajo se reportan los resultados obtenidos al cultivar fragmentos de *N. hirsutula* (Forster) Presl cv Duffii en condiciones asépticas con el objetivo de evaluar la influencia del medio mineral y suplementos en la obtención de plantas juveniles y fuentes secundarias de explantes para la propagación masiva y acelerada de esta variedad.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron fragmentos de plantas en estadios juveniles de *Nephrolepis hirsutula* (Forster) Presl cv Duffii obtenidas del desarrollo *in vitro* de rizomas. Los explantes de 6 mm de longitud contaban con 5 ó 6 raíces de 5 a 7 mm y 4 ó 5 frondes decapitados.

Se evaluó el efecto del crecimiento y desarrollo de plantas, así como de la producción de rizomas mediante la inoculación de 10 fragmentos en cada uno de los siguientes tratamientos:

1. Medio mineral de Gamborg (1968).
2. Medio mineral de Gamborg suplementado con 5 % de agua de coco.
3. Medio mineral de Gamborg suplementado con 10 % de agua de coco.
4. Medio mineral de Gamborg suplementado con 5×10^{-7} de Kinetina.
5. Medio mineral de Gamborg suplementado con 10^{-6} de Kinetina.
6. Medio mineral de Gamborg suplementado con $1,5 \times 10^{-6}$ de Kinetina.
7. Medio mineral de Gamborg suplementado con 2×10^{-6} de Kinetina.

Los explantes se mantuvieron entre 25 y 29 °C en condiciones de luz artificial continua de baja intensidad.

A los 35 días de cultivo se realizó la evaluación de todos los tratamientos; teniendo en cuenta los siguientes caracteres:

1. Coloración de los explantes.
2. Formación de rizomas.
3. Longitud de los rizomas.
4. Formación de primordios foliares.
5. Desarrollo de frondes.
6. Longitud de los frondes.
7. Formación de raíces.
8. Longitud de las raíces.

El tratamiento I se mantuvo bajo condiciones experimentales hasta los 60 días, evaluándose los mismos caracteres.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las características del desarrollo de plantas juveniles a partir de fragmentos de *Nephrolepis hirsutula* (Forster) Presl. cv Duffii al cabo de 35 días en cultivo bajo las condiciones referidas se reflejan en la Tabla I.

Se observa que la coloración verde intenso que presentan las jóvenes plantas es independiente de los tratamientos en que se desarrollaron. Por otra parte el empleo del medio de Gamborg no favorece la formación de nuevos rizomas, a diferencia de los tratamientos en que el medio de Gamborg es suplementado con agua de coco o Kinetina. El empleo del agua de coco promueve la formación de 2 a 3 rizomas de 5 a 6 mm de longitud en el 50 % de los explantes como mínimo y la duplicación de la concentración del agua de coco no refleja respuestas bien distintas en este sentido. La utilización de la Kinetina como suplemento promueve una producción variable de rizomas en el 50 % de los explantes, sólo cuando se adiciona al medio en la concentración menor, oscilando la longitud de los rizomas entre 5 y 8 mm. Concentraciones de 10^{-4} o superiores no promueven la formación de rizomas en esta variedad, al menos a los 35 días de cultivo. Resulta evidente que la formación de frondes se produce en todos los tratamientos de una manera satisfactoria; no obstante los valores menores se obtienen de cultivar los fragmentos utilizados como explantes en el medio de Gamborg sin otro tipo de suplemento. El número de pequeños frondes obtenidos al suplementar el medio de Gamborg con 10^{-4} de Kinetina resulta notable y el número de primordios foliares contados en el fragmento denota un ritmo continuo. La longitud de los frondes oscila entre 10 y 23 mm, lográndose los rangos más elevados en los mismos tratamientos en que se producen rizomas. Finalmente es de destacar que en cualquiera de los tratamientos empleados se logra la formación de raíces en número variable y generalmente superior a 5 y de un desarrollo grande en los tratamientos en que el medio fue suplementado con agua de coco al 5 y 10 %.

Haciendo un análisis general de los distintos caracteres, evaluados se evidencia que la producción *in vitro* de las primeras fases de desarrollo de plantas de *Nephrolepis hirsutula* (Forster) Presl cv Duffii es posible a partir de fragmentos en cualquiera de los tratamientos aplicados. No obstante, teniendo en cuenta los caracteres evaluados resulta evidente que las plantas más vigorosas se obtienen cuando los medios se suplementan con agua de coco en cualquiera de las concentraciones utilizadas, ya que cuentan con un número variable de raíces entre 5 y 12 de más de 15 mm de longitud y con más de 40 frondes que oscilan entre 15 y 20 mm aproximadamente. Si a esto se añade que en el 50 % de los casos, como mínimo, se producen entre 1 y 2 rizomas de 5 mm de longitud, la adición de agua de coco al medio de Gamborg es la más adecuada para la obtención acelerada de plantas jóvenes que puedan llevarse a sustrato definitivo. Finalmente si se consideran que al cabo de 35 días puede obtenerse como mínimo 3 explantes con caracteres similares a los utilizados en este trabajo y rizomas capaces de desarrollar plantas, los tratamientos en que el agua de coco se utiliza como suplemento al medio de Gamborg constituyen los medios más favorables para el incremento rápido del número de plantas *in vitro* de esta variedad.

En la Tabla II se reflejan las características del desarrollo de plantas juveniles a partir de fragmentos de *Nephrolepis hirsutula* (Forster) Presl cv Duffii al cabo de 60 días en cultivo. Se observan que al momento de evaluar no existen rizomas ni primordios foliares; y que el número de frondes se ha incrementado en 5 y el número de raíces en algunos explantes ha aumentado así como su longitud. Si se tiene en cuenta que estos resultados se corresponden con el desarrollo alcanzado en 25 días adicionales de cultivo resulta evidente que el ritmo de desarrollo de las plantas disminuye de manera sensible, tanto en la cantidad de nuevos órganos producidos como en el crecimiento de los mismos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten considerar que la propagación masiva y acelerada de *Nephrolepis hirsutula* (Forster) Presl cv Duffii no debe realizarse utilizando el medio mineral Gamborg sin suplementos; que se requiere de agua de coco al 5 ó 10 %; o de Kinetina al 5×10^{-7} ; y que lo más recomendable teniendo en cuenta la vigorosidad de las plantas, las posibilidades de replicación de cultivos y el costo de los productos a utilizar es el medio de Gamborg suplementado con 5 % de agua de coco. Además es de particular interés el logro de un número de plantas jóvenes de una variedad cuyo cultivo en nuestros umbráculos ha resultado tradicionalmente dificultosa.

Tabla I. Características de las plantas de *Nephrrolepis hirsutula* (Forster) Presl. cv Duffii desarrolladas en diferentes medios nutritivos (I, II, III, IV, V, VI, VII) a los 35 días en cultivo.

Tratamientos	Caracteres evaluados	Color	Formación de Rizomas	Longitud de los Rizomas (mm)	Formación de primordios foliares	Formación de Frondes	Longitud de los Frondes (mm)	Formación de raíces	Longitud de las raíces (mm)
I		verde intenso	0	0	0	30-40	13-16	5-6	5-7
II		verde intenso	0-3 50%	5-6	0-6	41-54	15-23	5-10	15-22
III		verde intenso	0-2 60%	5-6	0-3	47-65	16-20	5-12	15-26
IV		verde intenso	0-5 50%	5-8	1-5	35-51	11-22	7-14	7-14
V		verde intenso	0	0	6-12	63-70	10-14	7-14	9-12
VI		verde intenso	0	0	0-2	50-69	10-15	4-7	7-9
VII		verde intenso	0	0	0-1	40-47	10-15	5-9	6-9

Tabla II. Características de las plantas de *Nephrolepis hirsutula* (Forster) Presl. cv Duffii desarrolladas en medio mineral de Gamborg (1968) a los 60 días en cultivo.

Caracteres evaluados	Resultados
1. Color	verde intenso
2. Formación de Rizomas	0
3. Longitud de los Rizomas (mm)	0
4. Formación de Primordios Foliareos	0
5. Formación de Frondes	35-45
6. Longitud de los Frondes (mm)	17-20
7. Formación de Raíces	5- 7
8. Longitud de las Raíces (mm)	5- 8

BIBLIOGRAFIA

1. Beck, M.J. and J.D. Caponetti (1983)
The effects of Kinetin and Naphthaleneacetic acid in vitro shoot multiplication and rooting in the fishtail fern. *Am. J. Bot.* 70 (1): 1-7.
2. Caponetti, J.D. and T.E. Byrne (1985)
Morphogenesis in Boston ferns by tissue culture in Abstracts Botanical Society of America. *Am. Journal of Botany* 72 (6): 920.
3. Chen, S.Y. and P.E. Read (1983)
Micropropagation of Leatherleaf fern (*Rumohra adiantiformis*). *Proc. Fla State Hort. Soc.* 96: 266-269.
4. Chen, Shirmy Y., P.E. Read and J.W. Hall (1985)
Influence of light, Kinetic, 2.4-D and physical treatment of *Rumohra adiantiformis* rhizome tips cultured in vitro in Abstracts Botanical Society of America. *Am. J. of Bot.* 72 (6): 921.
5. Díaz Canals, L., E. Peña García y E. Grillo Mensa (1987)
Crecimiento in vitro de *Nephrolepis cordifolia* (L.) Presl. *Rev. del Jardín Botánico Nacional.* III (2): 79-93.
6. Dykeman, B.W. and B.G. Cumming (1985)
In vitro propagation of the Ostrich Fern (*Matteuccia struthiopteris*). *Can. J. Plant Sci.* 65: 1025-1032.
7. Edwards, Ma. E. (1977)
Carbon Dioxide and Ethylene Control of spore Germination in *Onoclea sensibilis* L. *Plant. Physiol.* 59: 756-758.
8. Faivre-Baron, M. (1980)
Effect of two Inhibitors of Protein Synthesis on the Prothallus Morphogenesis of a Fern. *Flora*, 169: 467-475.
9. Furuya, A, Kadota and H. Vematsu-Kaneda (1982)
Percent Pfr-Dependent Germination of Spores in *Pteris vittata*. *Plant. Cell Physiol.* 23 (7): 1213-1217.

10. Gamborg, D.L.; R.A. Miller and K. Ojima (1968)
Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells.
Exp. Cell. Res. 50:151-158.
11. Hurell-Py, G. (1945)
La culture des prothalles d *Asplenium* en milieu liquide. Bull. Soc.
Bot. Fr. 92: 37-40.
12. _____ (1951)
Recherches preliminaires sur la culture aseptique des prothalles de
filicinees. Rev. Gén. Bot. 57: 637-735.
13. Kshirsagar, M.K. & A.R. Mehta (1978)
In vitro studies in ferns: Growth and differentiation in rhizome
callus of *Pteris vittata*. Phytomorphology 28 (1): 50-58.
14. Laird, S. and E. Sheffield (1986)
Antheridia and Archegonia of the Apogamous Fern *Pteris cretica*. Annals
of Botany, 57: 139-143.
15. Loescher, W.H. and C.N. Albrecht (1979)
Development in vitro of *Nephrolepis exaltata* cv *Bostoniensis* Runner
Tissues. Physiol. Plant. 47:250-254.
16. Nagy, A.H.; G. Paless and G. Vida (1978)
Differential Protein Synthesis after red Light Illuminations in
Germinating Fern Spores. Biologia Plantarum. 20 (3): 193-200.
17. Paless, G.; G. Vida and A.H. Nagy (1984)
Phytochrome-mediated control of protein synthesis during germination
of fern spores. Acta Botanica Hungarica 30 (1-2): 191-200.
18. Richards, J.H.; J.Z. Beck and A.M. Hirsch (1983)
Structural Investigations of asexual reproduction in *Nephrolepis*
exaltata and *Platyterium bifurcatum* and *Platyterium bifurcatum*. Am J.
Bot. 70 (7): 993-1001.
19. Warne, T.R. and R.M. Lloyd (1980)
The role of spore germination and gametophyte development in habitat
selection: temperature responses in certain temperate and tropical
ferns. Bull. of the Turrey Botanical Club. 107 (1): 57-64.
20. White, R.A. (1969)
Vegetative Reproduction in the Ferns I. Leaf Buds of *Grammitis*
tenella. American Fern Journal (s/n): 108-118.

Recibido: 18 de enero de 1988.