

## Especificidad del hongo micorrizico (*Rhizoctonia sp.*) en *Phalaenopsis sp.*, *Cymbidium sp.*, *Trichoceros antenifer*, *Oncidium excavatum*, y *Cyrtorchilus sp.*

**Silvia L. Ordoñez, Dora P. Pillacela, Jazmín M. Salazar, Denisse F. Peña**

Carrera de Ingeniería Agronómica, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Avenida 12 de Octubre y Diego de Tapia, Cuenca, Ecuador.

Autor de correspondencia: denisse.pena@ucuenca.edu.ec

Fecha de recepción: 21 de octubre 2015 - Fecha de aceptación: 10 de enero 2016

### RESUMEN

Las orquídeas producen abundantes semillas pequeñas, careciendo de endospermo, cotiledones y sustancias de reserva para llevar a cabo su germinación. Es por esto que estratégicamente las semillas establecen una relación simbiótica con un hongo micorrízico que favorece a su germinación y desarrollo. El objetivo de este estudio fue determinar la especificidad del hongo micorrízico (*Rhizoctonia sp.*) en la germinación de cinco géneros de orquídeas. Se usaron dos medios de cultivo: 1) Phytamax™ y 2) avena-agar+*Rhizoctonia sp.* Los resultados evaluados a los 45 y 75 días demuestran que no existe especificidad entre el hongo *Rhizoctonia sp.* y *Trichoceros antenifer*, especie de la cual se aisló el hongo. La germinación en tres de los cinco géneros evaluados fue mayor en el tratamiento avena-agar+*Rhizoctonia sp.*, evidenciando también mayor tamaño y vigor las plantas que se desarrollaron en este tratamiento, aunque estos datos no fueron evaluados. Los resultados sugieren también que la planta hospedera del hongo inoculado podría tener una ventaja en cuanto al tiempo requerido para su germinación; sin embargo otras, especies también se ven favorecidas con el inóculo, aunque éste sea obtenido de otra fuente.

Palabras clave: Semillas de orquídeas, *Rhizoctonia sp.*, germinación simbiótica.

### ABSTRACT

Orchids produce abundant small seeds, lacking endosperm, cotyledons and reserve substances to support germination. That is why the seeds strategically establish a symbiotic relationship with a mycorrhizal fungus favoring germination and development. The aim of this study was to determine whether the mycorrhizal fungus *Rhizoctonia sp.* establishes a specific association with five orchid genera that stimulates seed germination. Two culture media were used: 1) Phytamax™ and 2) oatmeal-agar+*Rhizoctonia sp.* The germination was assessed at day 45 and 75 and showed no specificity between the fungus *Rhizoctonia sp.* and *Trichoceros antenifer*, the orchid species from which the fungus was isolated. Germination in three of the five genera tested was higher in the treatment oatmeal-agar+*Rhizoctonia sp.*, showing in this treatment increased sizes and the development of vigor plants; although these data were not evaluated. The results also suggest that the host plant of the inoculated fungus could have an advantage in terms of time required for germination, but other species are also favored with the inoculum even if isolated from a different species.

Keywords: Seeds of orchids, *Rhizoctonia sp.*, symbiotic germination.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las orquídeas comprenden entre 25-30 mil especies y 6 mil híbridos (Menchaca, 2011): presentan una amplia distribución geográfica, encontrándose en regiones de clima tropical, templado y alpino, en zonas tropicales prevalecen las formas epífitas y en climas fríos las orquídeas terrestres (Guerra & Huamani, 1995).

El porcentaje de germinación de semillas de orquídeas es muy bajo, logrando que sólo 10 o 15 semillas germinen de un total de 1 millón, y sólo una o dos lleguen a ser plantas adultas después de dos o tres años (Menchaca, 2011). Las condiciones de calor, humedad y aireación no son suficientes para la germinación de semillas de orquídeas (Junta de Andalucía, 2008). Éstas, en la mayoría de los casos, requieren de la simbiosis con un hongo micorrízico para germinar. (Damon *et al.*, 2004; Rivas *et al.*, 1998) pues de ellos obtienen la energía en la naturaleza (Rasmussen, 1995).

En condiciones de laboratorio es posible conseguir la germinación de semillas de orquídeas en ausencia del hongo micorrízico si se siembra en medios de cultivo con alta concentración de azúcar (Menchaca, 2011). Sin embargo, cada especie de orquídea tiene diferentes necesidades de nutrientes para germinar (Damon *et al.*, 2004). El uso de hongos micorrízicos para cultivar semillas de orquídeas *in vitro* conocido como germinación simbiótica de semillas, es actualmente una importante herramienta para la conservación (Massey & Zettler, 2007). Taylor & Bruns (1997) reportan que algunas orquídeas, generalmente las epífitas, son específicas en su interacción micorrízico. Por el contrario, Otero *et al.* (2002, 2004, 2007), concluyen que la especificidad del hongo micorrízico en orquídeas epífitas tropicales puede ser variable.

En este artículo reportamos los resultados de especificidad del hongo *Rhizoctonia sp.* en la germinación simbiótica de cinco géneros de orquídeas.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se usaron semillas de *Phalaenopsis sp.*, *Cymbidium sp.*, *Trichoceros antenifer*, *Oncidium excavatum* y *Cyrtorchilum sp.* que se mantuvieron almacenadas en refrigeración a 4°C por un período de 24 meses. Éstas fueron desinfectadas usando cloro 2% por 10 segundos, ejerciendo presión mediante el uso de una jeringa plástica que sirvió también como contenedor durante el enjuague que se realizó por tres veces usando agua destilada estéril. Las semillas desinfectadas, fueron sembradas en cajas petri que contenían dos diferentes medios de cultivo: 1) Phytamax<sup>TM</sup> suplementado con sacarosa 30 g l<sup>-1</sup>, y 2) avena-agar sin adición de sacarosa. La siembra de las semillas se realizó en cámara de flujo laminar, usando un asa de laboratorio como medida de siembra para cada caja. Las semillas sembradas en medio avena-agar fueron inoculadas con un centímetro cuadrado de agar PDA<sup>1</sup> que contenía cultivo del hongo *Rhizoctonia sp.*, previamente aislado de raíces de *Trichoceros antenifer*. Los tratamientos fueron incubados en un cuarto de cultivo con foto-período de 16 h luz. Los datos se registraron a los 45 y 75 días.

El experimento se realizó utilizando un diseño completamente al azar con arreglo factorial con 5 repeticiones por tratamiento. Se aplicó el análisis de varianza a los resultados de la prueba, las diferencias significativas se evaluaron a través de la prueba de Duncan en el programa estadístico SPSS 22.0.

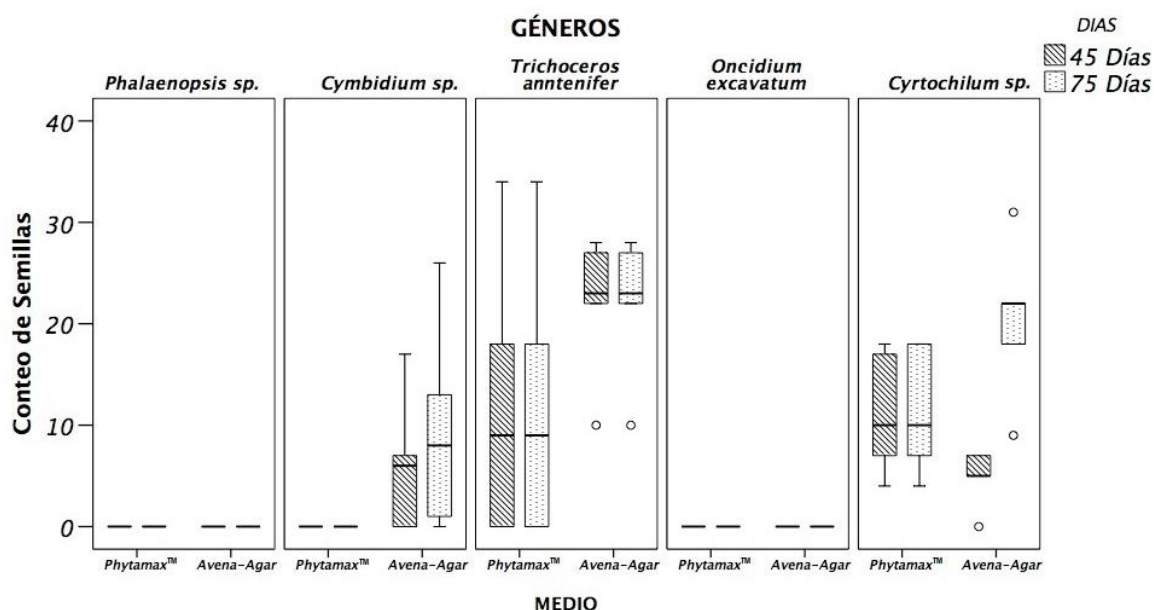
## 3. RESULTADOS

A los 45 días de la siembra *Trichoceros antenifer* presentó el mayor número de semillas germinadas, 22 en el medio de avena-agar+*Rhizoctonia sp.* y 12 en el medio Phytamax<sup>TM</sup>; el género *Cyrtorchilum*

---

<sup>1</sup> PDA: Potato dextrose agar

*sp.*, por el contrario, presentó la mayor germinación en el medio Phytamax™ 11 y 5 semillas en el medio avena-agar (Fig. 1). El género *Cymbidium* presentó también germinación pero únicamente en el medio avena-agar+*Rhizoctonia sp.* La diferencia de germinación fue estadísticamente significativa solo para el caso de *Trichoceros antenifer*.



**Figura 1.** Diagramas de caja-bigotes visualizando la germinación de las cinco semillas de orquídeas en función del medio Phytamax™ y avena-agar, enriquecido del hongo *Rhizoctonia sp.*, después de 45 y 75 días.

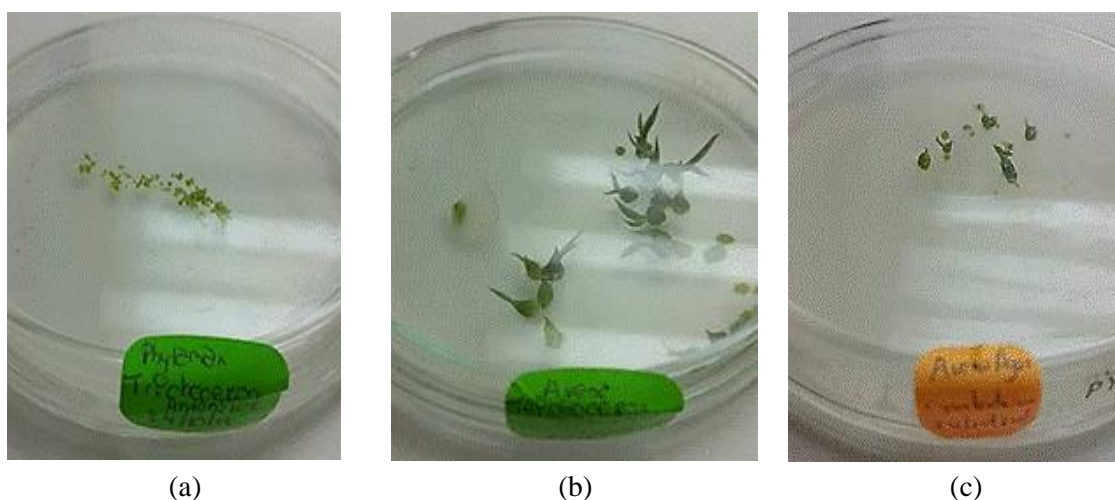
A los 75 días de la siembra no se registró germinación en nuevos géneros; sin embargo, el número de semillas germinadas ascendió en todos los tratamientos registrados a los 45 días. El género *Cyrtorchilum* incrementó significativamente su germinación en el medio de avena-agar + *Rhizoctonia sp.*, modificando los resultados obtenidos a los 45 días, cuando la respuesta de germinación fue superior en el medio Phytamax™.

Los resultados obtenidos muestran que el hongo *Rhizoctonia sp.*, aislado de *Trichoceros antenifer* no es específico de este género, teniendo efecto como inductor de la germinación también en los géneros *Cymbidium* y *Cyrtorchilum*; los resultados obtenidos sugieren además que el tiempo de contacto hongo semilla, requerido para la germinación, podría ser mayor en especies que no han sido hospederas del hongo.

#### 4. DISCUSIÓN

Otero *et al.* (2003), en su investigación sobre germinación simbiótica de semillas de *Tolumnia v.*, mencionan que el hongo no tiene la capacidad para estimular el crecimiento de las semillas y proponen que existe un potencial para la evolución de especificidad en la interacción de orquídeas y sus hongos micorrízicos. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación apoyan la hipótesis de Otero *et al.* (2002, 2004 y 2007), quien concluye que la especificidad del hongo micorrízico en orquídeas puede ser variable. Masuhara & Katsura (1994), reportan que, al inocular *Rhizoctonia solani* aislado de una fuente no micorrízica en *Spiranthes sinensis*, obtuvieron resultados positivos en cuanto a la producción de hojas nuevas, incrementando de 3 a 6 hojas después de tres meses de crecimiento; concluyendo que un hongo aislado de otra fuente no micorrízica tiene el mismo efecto que los provenientes de la asociación con orquídeas. Por otra parte, Molina Segovia (2012), menciona que la inoculación de endomicorrizas en orquídeas mejora una serie de aspectos como: altura y número de

hojas de las plantas de orquídeas, con valores estadísticos significativos. En el presente trabajo, no se evaluaron estos parámetros; no obstante, las diferencias en el desarrollo son evidentes si comparamos los resultados en los dos tratamientos (Fig. 2.).



**Figura 2.** Germinación de semillas de orquídeas: (a) *Trichoceros antenifer* en medio Phytamax™, (b) *Trichoceros antenifer* en medio avena-agar+*Rhizoctonia sp.*, y (c) *Cymbidium* en medio avena-agar+*Rhizoctonia sp.*

## 5. CONCLUSIONES

Los resultados indican que el hongo *Rhizoctonia sp.*, aislado de raíces de *Trichoceros antenifer*, no es específico de este género, favoreciendo también la germinación de semillas de *Cymbidium* y *Cyrtorchilum*. La interacción del hongo *Rhizoctonia sp.* mejora significativamente la germinación de *Trichoceros antenifer*, *Cymbidium* y *Cyrtorchilum* en comparación con el medio de cultivo Phytamax™, comúnmente utilizado para la germinación de semillas de orquídeas en laboratorio. Los resultados variables obtenidos con el género *Cyrtorchilum* a los 45 y 75 días sugieren que los géneros de orquídeas que no han sido hospederas del hongo inoculado podrían requerir mayor cantidad de tiempo que la especie de la cual fue aislado.

## BIBLIOGRAFÍA

- Damon, A., G. Aguilar, L. Rivera, V. Nikolaeva, 2004. *Germinación in vitro de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco*, Chiapas, México: Revista Chapingo.
- Guerra, J., H. Huamani, 1995. *Caracterización edafoclimática del hábitat de las orquídeas, Perú*. Universidad Nacional Agraria de la Selva, Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana, 58 pp. Disponible en: <http://www.iiap.org.pe/Upload/Publicacion/L012.pdf>.
- Junta de Andalucía, 2008. *Orquídeas del Parque Natural Sierra de Grazalema* (2ª ed.). Coordinación: Velasco Ortega, L., G. Pino Donoso. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, 259 pp. Disponible en: <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/porta/web/menuitem.7e1cf46ddf59bb227a9ebe205510e1ca/?vgnnextoid=4eb9b2191a0bc110VgnVCM2000000624e50aRCRD&vgnnextchannel=1f27dfde043f4310VgnVCM1000001325e50aRCRD>.
- Massey E., L. Zettler, 2007. An expanded role for in vitro symbiotic seed germination as a conservation tool: two case studies in North America (*Platanthera leucophaea* and *Epidendrum nocturnum*). *Lankesteriana*, 7(1-2), 303-308.

- Masuhara, G., A. Katsuya, 1994. In situ and in vitro specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames, var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). *New Phytologist*, 127(4), 711-718.
- Menchaca, R.A., 2011. *Manual para la propagación de orquídeas* (1ª ed.). CONACYT-CONAFOR, México, 56 pp. Disponible en: [http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/MANUAL\\_PARA\\_LA\\_PROPAGACION\\_DE\\_ORQUIDEAS.PDF](http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/MANUAL_PARA_LA_PROPAGACION_DE_ORQUIDEAS.PDF).
- Molina Segovia, F.A., 2012. *Aislamiento, caracterización y efecto de la inoculación de endomicorrizas orquideales sobre dos especies híbridas en el noroccidente de Pichincha, Ecuador*. Tesis de grado. Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias, Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE), Quito, Ecuador.
- Otero, J.T., J.D. Ackerman, P. Bayman, 2002. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, 89, 1852-1858.
- Otero, J.T., P. Bayman, J. Ackerman, 2003. Variación en germinación simbiótica entre semillas de *Tolumnia variegata* y entre hongos micorrízicos. *Acta Agronómica*, 58(4), 270-276.
- Otero, J.T., J.D. Ackerman, P. Bayman, 2004. Diversity in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology*, 13, 2393-2404.
- Otero, J.T., N.S. Flanagan, E.A. Herre, J.D. Ackerman, P. Bayman, 2007. Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 94(12), 1944-1950.
- Rasmuseen, H.N., 1995. *Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plants*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Rivas, M., J. Warner, M. Bermúdez, 1998. Presencia de micorrizas en orquídeas de un jardín botánico neotropical. *Revista de Biología Tropical*, 46(2), 211-216.
- Taylor, D.L., T.D. Bruns, J.R. Leake, D.J. Read, 1997. Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. *Mycorrhizal Ecology*, 157, 375-413.