

# AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E INOCULACIÓN CON ENDOMICORRIZAS ORQUIDEALES EN ESPECIES DE ORQUIDEAS

B. M. de la Noval<sup>1</sup>; A. Oria<sup>2</sup>; L. Casadesus<sup>2</sup>; M. Gómez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Carr. de Tapaste km 3.5, A.P. 1 San José de las Lajas, La Habana, Cuba, C.P. 32 700. Telefax: (53)(646)3867, E-mail: inca@ceniai.inf.cu

<sup>2</sup>Facultad Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

<sup>3</sup>Centro de Investigación Científica de Yucatán, Yucatán, México.

## RESUMEN

Las orquídeas se encuentran ampliamente distribuidas en los trópicos, adquiriendo su cultivo un doble significado, pues además de servir de ornamento al entorno, su comercialización puede constituir un renglón importante en nuestra economía. Los experimentos se desarrollaron con el objetivo de caracterizar la biota fúngica de raíces de orquídeas y estudiar la micorrización de plantas *ex vitro*. De los aislamientos se seleccionaron 25 cepas pertenecientes a la microflora de raíces de *Cattleya* sp., *Encyclia belizensis* y *Oncidium sphacelatum*, las que se encuentran identificadas hasta género, predominando el género *Fusarium*. Se observó que la inoculación con hongos micorrízicos del tipo orquídeal (*Rhizoctonia solani* cepas C96/45 y C96/48) produjo un efecto positivo sobre el establecimiento y desarrollo de las plántulas, obteniendo incrementos de 19.44 y 97.82 % de masa seca foliar y, 52.61 y 57.5 % de masa seca radical, respectivamente, destacándose la cepa C96/48.

**PALABRAS CLAVES:** Vitroplantas, Orchidaceae, *Rhizoctonia solani*.

## ISOLATION, CHARACTERIZATION AND INOCULATION OF ORCHID ENDOMYCORRHIZAS IN SPECIES OF ORCHIDS

## SUMMARY

Orchids are found in many tropical places. Their production has a double importance: as an ornament and as an important economic resource. The purpose of this study was to characterize the fungal population in orchid roots and study the *ex vitro* plant mycorrhization. Of the isolations we selected 25 strains of *Cattleya* sp., *Encyclia belizensis*, and *Oncidium sphacelatum* from roots. *Fusarium* was found to be the most common genera present. Inoculation with orchid mycorrhizal fungi (*Rhizoctonia solani* strain C96/45 and C96/48) produced a positive effect on the establishment and development of plantlets with 19.44 and 97.82% dry leaf mass and 52.61 and 57.5% dry root mass, respectively. The strain C96/48 was the best.

**KEY WORDS** Micropropagated plants, Orchidaceae, *Rhizoctonia solani*.

## INTRODUCCIÓN

La orquídea es una flor de elevado atractivo comercial que resume belleza, encanto y fragancia. En Cuba se ha encontrado gran diversidad de orquídeas ampliamente distribuidas, con caprichosas formas y colores; pudiendo convertirse en un importante renglón comercial.

La propagación de orquídeas de forma comercial se ve limitada por poseer diminutas semillas con un embrión simple carente de endospermo, lo que la hace de difícil germinación y sobrevivencia, si no se encuentra un hongo micorrízico compatible el cual se encarga de suministrarle

los carbohidratos y nutrientes esenciales, aún hasta después de haber formado sus primeras hojas verdes (Richardson *et al.*, 1992), mientras que la micropropagación o producción *in vitro* de orquídeas nos permite la obtención masiva de plántulas a partir de semillas o yemas.

Los hongos que forman micorrizas con orquídeas, generalmente son saprófitos independientes o parásitos destructores de otros cultivos, representados principalmente por el género *Rhizoctonia* (Smith, 1963, citado por Oria, 1996; Rasmussen, 1992), lo que evidencia la estrecha especificidad que se establece en esta relación.

Por estas razones, es importante la búsqueda de tecnologías que aseguren una producción estable de plantas, tanto de forma artificial debido a su lenta propagación, como de forma natural, aportándole todas las condiciones de crecimiento necesarias, donde el establecimiento de los biofertilizantes juega un factor importante en la obtención de plantas vigorosas.

Teniendo en cuenta los aspectos antes mencionados, se propuso, realizar el aislamiento y caracterización, hasta género, de la microbiota fúngica asociada a raíces de orquídeas y el estudio de la micorrización de plantas *ex vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de hongos asociados a las raíces de orquídeas

Toma de muestras y aislamientos

Se seleccionaron localidades ubicadas en la provincia de La Habana, Cuba y en el estado de Quintana Roo, México, tomándose muestras de raíces de orquídeas adultas, en los meses de febrero a junio, de las especies siguientes:

Localidad	Especies de orquídeas muestreadas.
1.- Prov. La Habana, Cuba	
Puente Bacunayagua	<i>Cattleya</i> sp.
2.- Estado de Quintana Roo, México	
Akumal	<i>Encyclia belizensis</i>
Valle Hermoso	<i>Oncidium sphacelatum</i>

Se pesaron muestras de 1 g de raíces que fueron maceradas con 2 ml de agua destilada estéril, en cuarto de cultivo. Del extracto obtenido se tomó 1 ml para realizar diluciones seriadas (Harrigan y Mc Cance, 1968, citados por Martínez *et al.* (1981) y así obtener colonias aisladas, se inocularon en cajas Petri que contenían el medio PDA (papas, 250 g·litro<sup>-1</sup>; dextrosa, 20 g·litro<sup>-1</sup>; agar, 20 g·litro<sup>-1</sup>) y el medio Czapeck (NaNO<sub>3</sub>, 2 g·litro<sup>-1</sup>; KCl, 0.5 g·litro<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub> heptahidratado, 0.5 g·litro<sup>-1</sup>; FeSO<sub>4</sub>, 0.01 g·litro<sup>-1</sup>; sacarosa, 30 g·litro<sup>-1</sup>; agar, 12 g·litro<sup>-1</sup>), ajustados a pH 5.6 y 6.8, respectivamente; esterilizados a 121°C durante 15 min. La inoculación se realizó mediante el método de diseminación con espátula de Drigalsky estéril; aplicando 0.1 ml de las diluciones.

Todas las cajas Petri fueron incubadas a 29°C, durante un período no menor de 48 h a partir de las cuales se aislaron y depuraron las colonias que presentaron características morfológicas diferentes; las cepas así obtenidas fueron conservadas sobre ambos medios a 4°C.

Caracterización e identificación

Las cepas obtenidas fueron sembradas en cajas Petri con los medios PDA y Czapeck, incubándose a 29°C durante 48 h; se realizaron además microcultivos por el método de Riddel (Martínez *et al.*, 1981).

Para la identificación se consultaron los manuales clásicos para hongos (Barnett, 1962; Gilman, 1963).

Inoculación de plantas *ex vitro* de orquídeas, *Encyclia* sp. con endomicorrizas orquideales

El experimento se desarrollo en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), ubicado en el municipio de San José de las Lajas de la provincia La Habana, Cuba, bajo condiciones semicontroladas, en el período comprendido de marzo a mayo de 1996.

Las plantas *in vitro* de orquídeas pertenecientes a la especie *Encyclia* sp. fueron obtenidas por el Departamento de Genética y Mejoramiento del INCA, empleando el medio Knudson (Knudson, 1922, citado por Oria, 1996). Plántulas que poseían de dos a tres meses de desarrollo fueron seleccionadas según su talla, teniendo-se en cuenta el número y largo de las hojas, y la masa total podándosele las raíces para su transplante a condiciones de adaptación.

Como hongos endomicorrízicos se emplearon las cepas de *Rhizoctonia solani* C96/45 y C96/48 aisladas de *Phaseolus vulgaris* y *Cicer arietinum*, repectivamente, las que fueron donadas por el cepario del INIFAT, Cuba.

Para la preparación del inóculo los hongos micorrízicos fueron sembrados en medio PDA en plano inclinado, incubándose a 29°C durante 48 h. El micelio fue separado con asa de platino y agua destilada estéril.

La inoculación de las plantas *ex vitro* se realizó mediante la metodología de recubrimiento con inóculo micorrízico la cual se aplicó en la zona radical, según metodología descrita por Fernández *et al.* (1996).

Las plántulas inoculadas se sembraron en macetas plásticas, el sustrato lo constituyó una mezcla de cachaza, carbón vegetal y zeolita en una proporción de 1:1:1.

El muestreo se realizó a los 60 días de transplantadas, evaluándose la altura, el largo radical, el número de hojas, raíces nuevas e hijuelos y las masas frescas (MF) y secas (MS) foliares y radicales. Se calcularon los incrementos para todas las variables comparando los tratamientos inoculados con el testigo sin inocular.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cuatro observaciones; los datos fueron analizados por el

análisis de varianza de clasificación simple y las medias comparadas por la prueba de rango múltiple de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de hongos asociados a las raíces de orquídeas.

De las tres especies de orquídeas del muestreo, *Cattleya* sp., *Encyclia belizensis* y *Oncidium sphacelatum*, se aislaron un total de catorce, cinco y seis representantes de los taxones (Cuadro 1).

CUADRO 1. Distribución de los taxones aislados en las diferentes especies de orquídeas estudiadas.

Especies Orquídeas	<i>Aspergillus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Acremonium</i>	<i>Mycelia sterilia</i>
<i>Cattleya</i> sp.	1	6	1	2	3	1	0
<i>Encyclia belizensis</i>	2	1	0	1	0	1	1
<i>Oncidium sphacelatum</i>	0	0	1	0	1	0	3

El género mas representado fue *Fusarium* con un 28% de aparición.

En cuanto a las especies de orquídeas, en *Cattleya* sp. se presentó una mayor frecuencia de aparición de estos hongos, pues estuvieron presentes seis de los géneros identificados, aunque no hubo representación de *Mycelia sterilia*, que sí apareció en *Oncidium* y *Encyclia*. Este es un taxón importante ya que a él pertenecen los géneros fúngicos que se reportan como endomicorrizas orquideales, los que no han podido ser caracterizados por no contarse con las claves correspondientes.

Todo parece indicar que hay una especificidad bastante alta, en cuanto a su asociación con la microbiota, en las especies *Encyclia* y fundamentalmente *Oncidium* con sólo tres taxones representados.

Inoculación de plantas ex vitro de orquídeas, *Encyclia* sp. con endomicorrizas orquideales

La inoculación con hongos endomicorrízicos del tipo orquideal, produjo de forma general un efecto positivo sobre el desarrollo de las plantas ex vitro de orquídeas.

Al analizar la altura de la planta (Figura 1) encontramos que ambas cepas superan de forma significativa, sin diferir entre ellas, al testigo sin inocular, obteniéndose un 75.51 (C96/45) y 74.07% (C96/48) de incrementos; mientras que en la longitud radical no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos estudiados.

El Cuadro 2 muestra los valores obtenidos de número de hojas y raíces nuevas, donde se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Con respecto al número de hojas, la cepa de *Rhizoctonia solani* C96/48 logró superar tanto al testigo como al tratamiento inoculado con la cepa C96/45, con un incremento de 70%. Con relación al número de raíces nuevas, ambas cepas incrementaron esta variable en 133.33 (C96/45) y 266.66% (C96/48). Ambas son características importantes al evaluar la adaptación de plantas ex vitro de orquídeas, tén-gase en cuenta que la especie estudiada tiene un bajo número de hojas. Para el número de hijos no se encontró diferencias significativas.

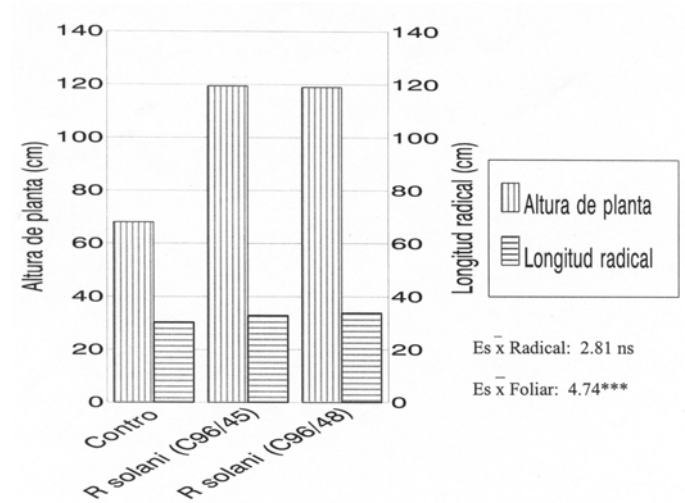


Figura 1. Altura de planta y longitud radical de plantas ex vitro de orquídeas inoculadas con *Rhizoctonia solani* y el testigo.

CUADRO 2. Número de hojas, raíces nuevas e hijos obtenidos en plantas ex vitro de orquídeas (*Encyclia* sp.) inoculadas con dos cepas de *Rhizoctonia solani* (C96/45 y C96/48) y sin inocular.

Tratamientos	Hojas	Raíces Nuevas	Hijos
Testigo	2.50 b <sup>z</sup>	1.50 c	0.50
<i>Rhizoctonia solani</i> C96/45	3.50 ab	3.50 b	1.25
<i>Rhizoctonia solani</i> C96/48	4.25 a	5.50 a	0.75
ES x:	0.36 *	0.50 **	0.35 <sup>NS</sup>

<sup>z</sup>Valores con la misma letra dentro de columnas son iguales de acuerdo a la prueba de Duncan a una P≤0.05.

<sup>NS</sup>, \*, \*\*: No significativa, significativa y altamente significativa a una P≤0.05 y 0.01, respectivamente.

Al analizar las masas frescas (MF) obtenidas (Figura 2), encontramos de igual forma diferencias entre los tratamientos. El tratamiento correspondiente a la cepa C96/48 logró superar en MF foliar al testigo e incluso al inoculado con la cepa C96/45, produciendo incrementos de 71.09%, mientras que la cepa C96/45 solo obtiene 18.85%. Si se tiene en cuenta que con respecto al número de hojas, ambas cepas no difieren significativamente,

podría entonces inferirse que este comportamiento de las MF foliares, sería producto del incremento del área foliar, variable que no fue evaluada en el presente trabajo.

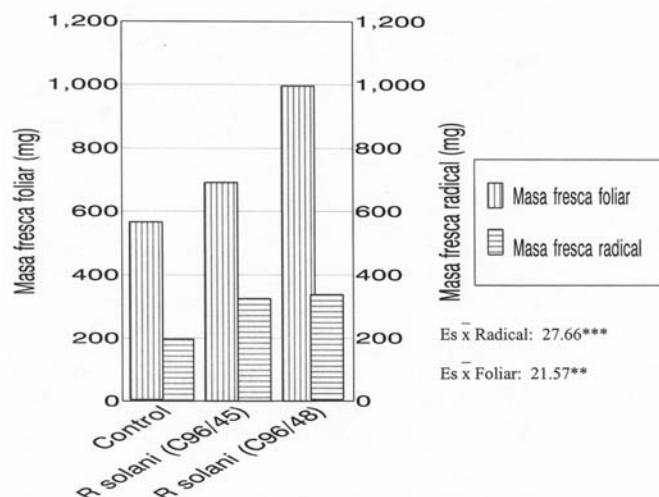


Figura 2. Masa fresca obtenidas de plantas *ex vitro* de orquídeas inoculadas con *Rhizoctonia solani* y el testigo.

Con respecto a las MF radicales ambas cepas mostraron igual comportamiento, superando al testigo sin inocular, con 65.14 (C96/45) y 68.56 % (C96/48) de incrementos; resultando aparentemente contradictorio si se analizan los valores de longitud radical, lo que demuestran que la evaluación de biomasa es una variable más confiable para evaluar el desarrollo vegetal ya que la determinación de longitudes no tiene en cuenta el área y biomasa producida.

La Figura 3 muestra las masas secas (MS) de los diferentes tratamientos donde se observa un comportamiento similar al obtenido por las MF, con incrementos de 19.44 (C96/45) y 97.82 % (C96/48) de MS foliar y, 52.61 (96/45) y 57.51 % (96/48) de MS radical.

Masuhara y Katsura (1994) al inocular *Spiranthes sinensis* con *Rhizoctonia solani*, aislada de una fuente no micorrízica, obtuvo resultados positivos en cuanto a la producción de hojas nuevas, incrementando de tres a seis hojas después de tres meses de crecimiento; concluyendo que los hongos aislados de otras fuentes tienen el mismo efecto que los provenientes de orquídeas.

## CONCLUSIONES

La especie *Cattleya* sp. tiene una mayor representación de géneros fúngicos en la microbiota asociada a su rizósfera; predominando el género *Fusarium*.

La inoculación, mediante el método de recubrimiento, con hongos endomicorrízico del tipo orquideal produjo un efecto positivo sobre el desarrollo de las plantas *ex vitro* de orquídeas.

Con la cepa de *Rhizoctonia solani* C96/48, de forma general, se obtuvieron los mejores resultados.

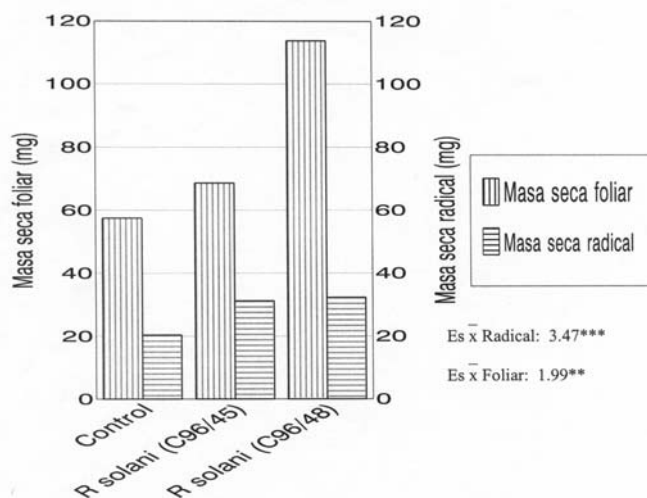


Figura 3: Masa seca obtenidas de plantas *ex vitro* de orquídeas inoculadas con *Rhizoctonia solani* y el testigo.

## LITERATURA CITADA.

- BARNETT, L.H. 1962. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 2<sup>da</sup> edición. New York, USA.
- GILMAN, C.J. 1963. Manual de Hongos del Suelo. Ed. Continental, S.A. D.F., México.
- FERNÁNDEZ, F. 1996. Metodología de recubrimiento de semillas con micorriza vesículo-arbuscular. Patente solicitada, La Habana, Cuba.
- MARTÍNEZ, J.; ROMAY, Z.; ROJAS, T.; GUERRA, G. 1981. Manual práctico de microbiología. Ministerio de Educación Superior. U.H. La Habana, Cuba. pp. 96-104.
- MASUHARA, G.; KATSUYA, A. 1994. *In situ* and *in vitro* specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon). Ames. var. amoena. (M. Bieberstein) Hara. (Orchidaceae). New Phytol. 127: 711-718.
- ORIA, A. 1996. Aislamiento e identificación de hongos radicales de orquídeas. Micorrización de vitroplantas de *Cattleya* sp. (Orchidaceae). Trabajo de Diploma. U.H. Fac. de Biología. La Habana, Cuba, pp. 7-28.
- RASMUSSEN, H.N. 1992. Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (Orchidaceae): Requirements for germination and establishment of mycorrhiza. Physiol Plant. 86: 161-167.
- RICHARDSON, K.A.; PETERSON, R.L.; CURRAH, R.S. 1992. Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Plantanthera hyperborea* (Orchidaceae). Can. J. Bot. 70: 291-300.