

# Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas

## Symbiotic vs. asymbiotic seed germination in epiphytic orchids

<sup>1</sup>Joel Tupac Otero Ospina, <sup>2</sup> Paul Bayman

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, AA. 237, Palmira, Valle del Cauca, Colombia. <sup>2</sup>Departamento de Biología, Universidad de Puerto Rico - Río Piedras. P. O. Box 23360, San Juan, PR 00931-3360. Autor para correspondencia: [jtoteroo@unal.edu.co](mailto:jtoteroo@unal.edu.co)

Rec.: 12-03-08 Acept.: 01-10-09

### Resumen

Se compara el crecimiento de plántulas de la orquídea epífita *Tolumnia variegata* en medios de agar con y sin hongos micorrízicos. Los métodos de germinación simbiótica produjeron embriones de *T. variegata* más desarrollados que los métodos de germinación asimbiótica y las diferencias fueron estadísticamente significativas. Las semillas en los controles en medio de celulosa sin hongos micorrízicos no germinaron. Las semillas de *Epidendrum ramosum*, *Lepanthes rupestris* y *Psychilis monensis* no mostraron diferencias significativas en germinación entre métodos simbiótica y asimbiótica utilizando hongos aislados de raíces de *T. variegata*, incluso algunos aislados del grupo *Rhizoctonia* parasitaron las semillas. Los resultados sugieren que las semillas de orquídeas epifitas y sus hongos micorrízicos son más específicos de lo que anteriormente se había creído y por tanto es necesario utilizar los hongos específicos para cada especie de orquídea. Además, se sugiere que los cultivadores de orquídeas podrían obtener mejores resultados en la propagación de orquídeas epifitas si utilizan metodologías de germinación simbiótica apropiadas.

**Palabras clave:** *Tolumnia variegata*, *Epidendrum ramosum*, *Lepanthes rupestris*, *Psychilis monensis*. Orchidaceae, germinación, hongos micorrízicos

### Abstract

We compared seedling growth of the epiphytic orchid, *Tolumnia variegata* in agar media with and without inoculated mycorrhizal fungi. Symbiotic germination produced more-developed embryos than asymbiotic germination. Differences were highly significant, although some isolates of *Rhizoctonia*-like fungi were parasitic on seeds. Control seeds in a cellulose medium without *Rhizoctonia*-like fungi did not germinate. Seeds of *Epidendrum ramosum*, *Lepanthes rupestris* and *Psychilis monensis* showed no significant differences between asymbiotic and symbiotic germination using mycorrhizal fungi isolated from *T. variegata* roots, suggesting high mycorrhizal specificity. Our data suggest that the relationship between epiphytic orchids and the mycorrhizal fungi is more specific than previously thought. The use of the right fungal strain may enhance germination performance. Orchid growers may achieve better results in the propagation of some epiphytic orchids using symbiotic germination.

**Key words:** *Tolumnia variegata*, *Epidendrum ramosum*, *Lepanthes rupestris* and *Psychilis monensis*, Orchidaceae, germination, mycorrhizal fungi

<sup>1</sup> Biólogo, Ph.D. en Biología y Filosofía.

<sup>2</sup> Biólogo, Ph.D. en Botánica.

## Introducción

Desde los trabajos pioneros de Knudson (1921), los horticultores han germinado las semillas de orquídeas mediante la utilización de combinaciones de nutrientes en condiciones estériles (Arditti 1992). Sólo cuando estos métodos fallan, los orquicultores retoman las técnicas de germinación de semillas usando los simbiontes naturales (Bernard 1899).

Todas las orquídeas requieren una asociación micorrízica para la germinación de sus semillas, principalmente con hongos basidiomicetos del grupo de *Rhizoctonia* (Rasmussen, 1995). *Rhizoctonia sensu latu* es un grupo artificial que incluye hongos cuyas etapas sexuales pertenecen a los géneros *Thanatephorus*, *Ceratobasidium*, *Sebacina* y *Tulasnella* (Sneh et al. 1991). Esta dependencia se asocia con las mínimas cantidades de nutrientes almacenados en las diminutas semillas de las orquídeas (Arditti y Ghani 2000). Sin embargo, los hongos del grupo de *Rhizoctonia* son bien conocidos por sus capacidades patogénicas en muchos grupos diferentes de plantas.

La germinación artificial de semillas de orquídeas terrestres de zonas templadas es extremadamente difícil y requiere formulaciones de nutrientes muy específicas en medios asépticos de germinación (Arditti, 1992). Por

tanto muchos cultivadores e investigadores utilizan hongos simbióticos para la propagación. Esto contrasta con el cultivo de muchas orquídeas epifitas tropicales, que en general son relativamente fáciles de germinar en condiciones asimbióticas. En consecuencia, los cultivadores de orquídeas tropicales no utilizan la germinación simbiótica para su propagación. Por estas razones se conocen mucho mejor las interacciones simbióticas de germinación de las orquídeas terrestres de zonas templadas que las de orquídeas epifitas tropicales. Sin embargo, las técnicas de germinación simbiótica de semillas epifitas tropicales podrían mejorar el éxito de cultivo de estas orquídeas tanto para fines comerciales como de conservación. El objetivo de este estudio fue comparar el éxito en programas de propagación de orquídeas epifitas tropicales utilizando técnicas simbióticas y asimbióticas de germinación.

## Materiales y métodos

*Tolumnia variegata* (Sw.) Braem (Orchidaceae; subfamilia Epidendroideae; tribu Maxillarieae) es una orquídea epífita tropical endémica de las Antillas Mayores, con excepción de Jamaica. Su nombre hace referencia a su alta variación en sus características florales (Foto 1) (Ackerman 1995). Las semillas para



**Foto 1:** Planta adulta de *Tolumnia variegata* en su hábitat natural.

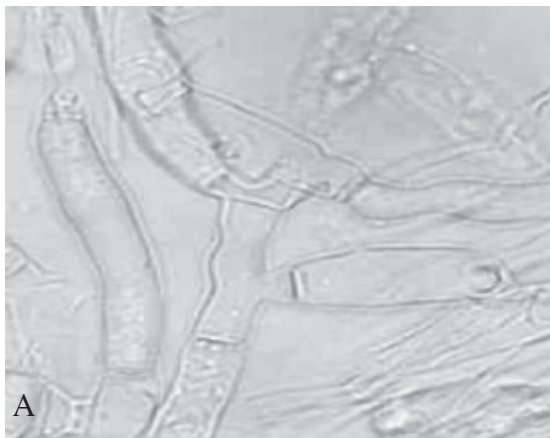
este estudio se recolectaron en una población en la zona adyacente a la reserva Natural Laguna de Tortuguero en Manatí (18° 27' 37" N, 66° 25' 30" O), Puerto Rico, entre 5 y 10 m.s.n.m. La precipitación promedio anual es de 1.688 mm y la temperatura de 25.4 °C. La zona es clasificada como bosque húmedo tropical en la escala de Holdridge (Ewel y Whitmore 1973).

Se realizaron cuarenta y ocho aislamientos de *Rhizoctonia* (Figura 1) a partir de plantas adultas y juveniles de diferentes poblaciones puertorriqueñas de *T. variegata* (Otero et al., 2002, 2004, 2005, 2007). Las raíces de plantas epifitas encontradas sobre arbustos de *Randia aculeata* L. (Rubiaceae) y *Psidium guajaba* L. (Myrtaceae) se lavaron con Tween 20 en agua corriente y se esterilizaron superficialmente mediante baños seriales en etanol (70%, 1 min), hipoclorito de sodio (2.5%, 2 min) y etanol (70%, 1min). Los segmentos de raíces fueron inoculados en condiciones asépticas en agar de papa y dextrosa (PDA) y agar de extracto de malta (MEA). Los hongos endófitos fueron identificados en el microscopio utilizando la guía de Sneh et al. (1991). Los hongos con características microscópicas de *Rhizoctonia* fueron transferidos a PDA y caracterizados hasta morfoespecies. Caracterizaciones moleculares están disponibles en la literatura (Otero et al. 2002, 2004, 2005, 2007).

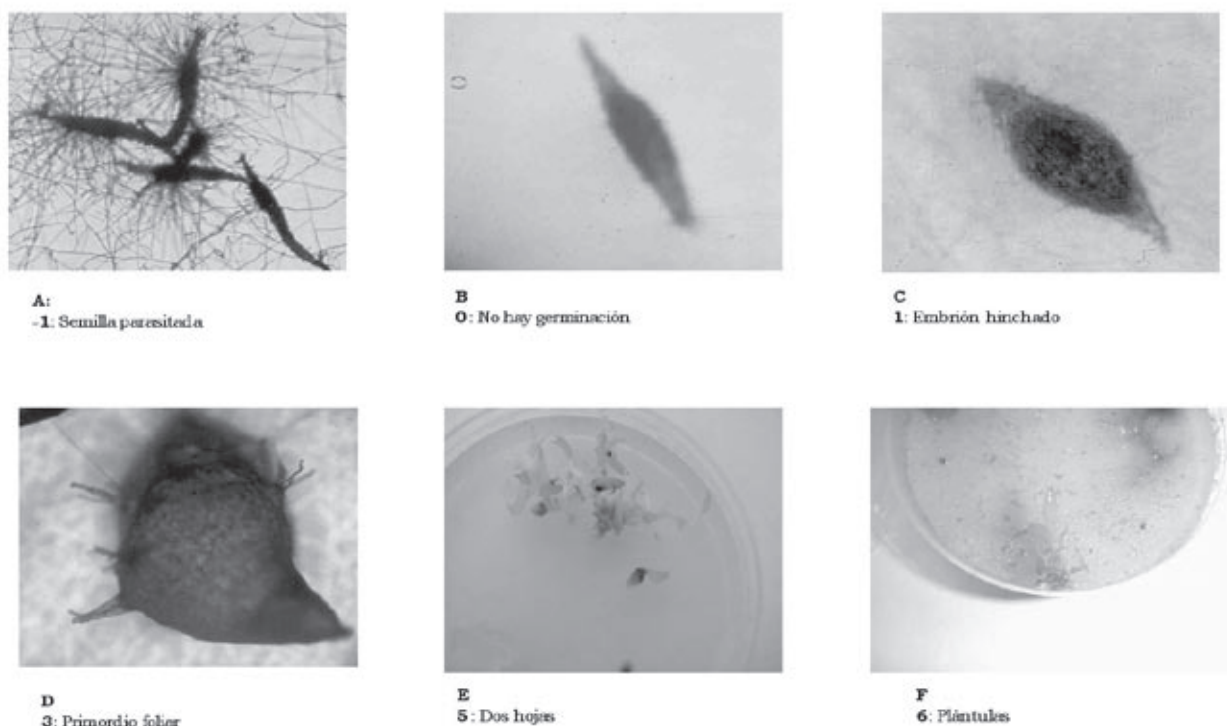
Los frutos de *T. variegata* fueron recolectados del sitio de estudio y esterilizados superficialmente utilizando los mismos

procedimientos que se usaron para las raíces. Las semillas fueron extraídas del fruto en condiciones estériles y su viabilidad fue evaluada con tinción de cloruro de trifenil tretrazolio (TTC, por sus siglas en inglés) (Otero et al., 2005).

Para examinar el efecto de los aislados de *Rhizoctonia* en la germinación de semillas, en placas Petri con Agar de Celulosa (CA) se sembró una mezcla de por lo menos 100 semillas de las tres plantas con mayor viabilidad, en cada una de las cuales se había inoculado un aislado diferente de *Rhizoctonia* tres días antes. Se evaluaron siete hongos y se incluyeron placas control inoculadas con semillas, pero sin el hongo. La germinación asimbiótica para cada especie de orquídea fue evaluada en cinco placas con medio comercial Knudson C (KC, Sigma Aldrich Inc.). Se realizaron dos tomas de datos, a las dos semanas y, dos meses después de la inoculación. Para ello se midieron diez plántulas escogidas al azar de cada placa Petri. Adicionalmente, cada semilla fue asignada a un estado de desarrollo de acuerdo con Stenberg y Kane (1998). En ausencia de germinación la semilla se registró en estado cero (0) (Figura 2B). El embrión < 1000 µm se registró en estado 1 (Figura 2C), con pelos absorbentes se registró en estado 2, con un primordio foliar se registró en estado 3 (Figura 2D), con una hoja en desarrollo y un primordio foliar se registró en estado 4, y con 2 hojas se registró en estado 5 (Figura 2E). Finalmente, las plántulas pequeñas se registraron en estado



**Figura 1:** *Rhizoctonia* sp., cepa aislada de raíces de *Tolumnia variegata*. (A) Constricción en la ramificación de las hifas de *Rhizoctonia*. (B) Células monilioides.



**Figura 2:** Estados de germinación de semillas y desarrollo de protocormos en *Tolumnia variegata*.

6 (Figura 2F). Las semillas parasitadas, determinadas por el crecimiento de hifas a partir de las semillas (Figura 2A), registraron valor negativo (-1).

El efecto de los hongos aislados de *T. variegata* también fue evaluado en la germinación de *Epidendrum ramosum* Jacq. (subfamilia Epidendroideae), *Lepanthes rupestris* Stimson (subfamilia Pleurotallidiinae) y *Psychilis monensis* Saulea (subfamilia Epidendroideae). Los datos fueron recolectados dos semanas después de la siembra de las semillas en la misma forma descrita anteriormente para los experimentos de germinación de semillas de *T. variegata*. Para el análisis de los resultados se utilizó la varianza de una vía ya que cumplían con los requisitos de normalidad exigidos para el análisis.

## Resultados

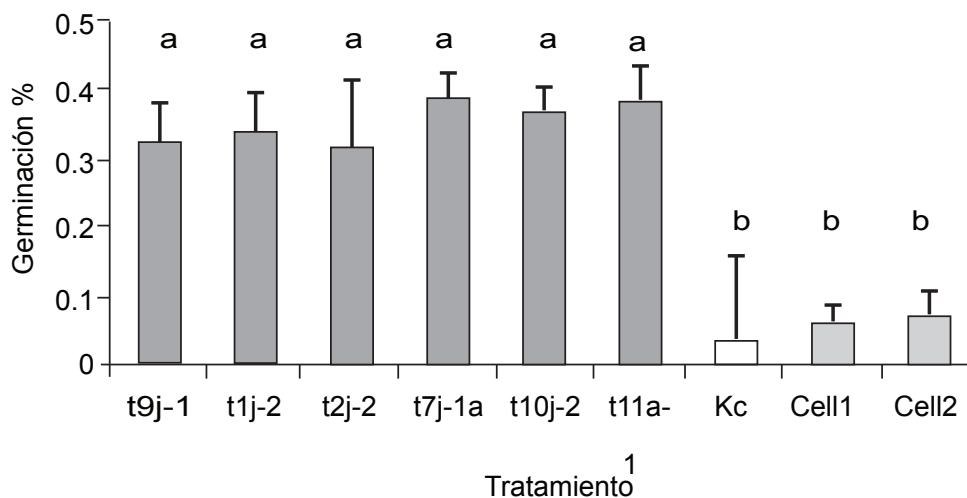
En total fueron aislados 55 hongos (clasificados en 26 morfoespecies) de raíces de *T. variegata* y 48 hongos (21 morfoespecies) con características de *Rhizoctonia* (87.3%), 31 de los cuales (en 13 morfoespecies) fueron evaluados como micorrizantes. Algunos aislados

fueron micorrízicos, pero otros parasitaron las semillas. Trece (6 morfoespecies) mostraron un efecto positivo en la germinación de semillas.

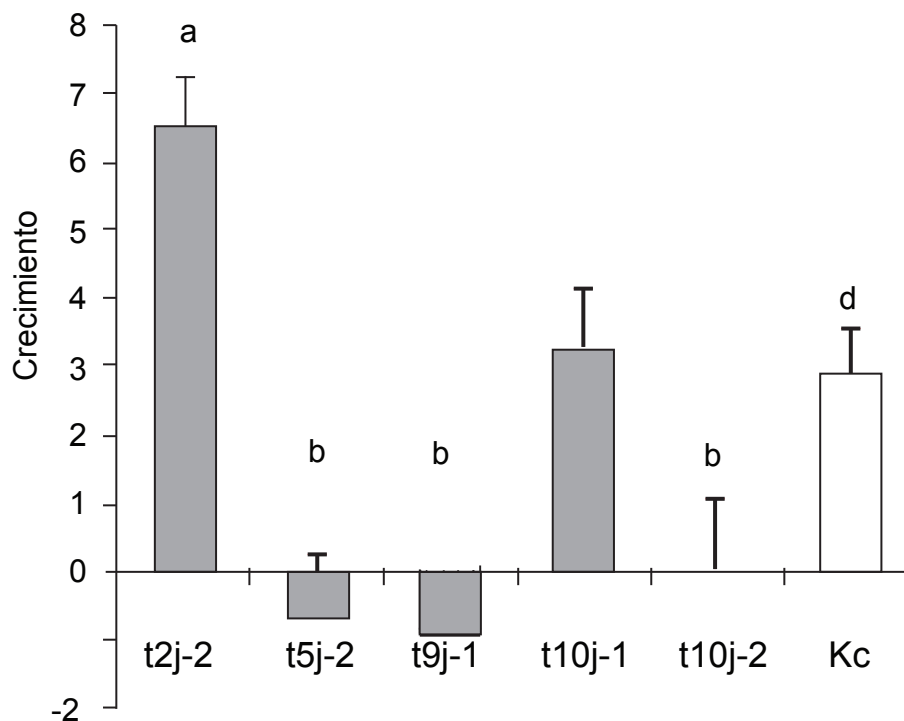
Los embriones de *T. variegata* que germinaron en presencia de uno de los 13 aislados de *Rhizoctonia* aislados a partir de *T. variegata* fueron significativamente más grandes que aquellos que germinaron en el medio de Knudson (ANOVA de una vía,  $F_{(1,9)} = 63,00$ ,  $P < 0.0001$ ) dos semanas después de haber sido inoculados (Figura 3). También se encontraron diferencias significativas (ANOVA de una vía,  $F_{(1,9)} = 62,32$ ,  $P < 0.0001$ ) dos meses después de la inoculación (Figura 4).

La germinación de otras especies de orquídeas con hongos micorrízicos de *T. variegata* no mostró ventajas relativas en relación con la germinación simbiótica (ANOVA de una vía, *E. ramosum*  $F_{(1,7)} = 1,15$ ,  $P = 0.32$ ; *L. rupestris*  $F_{1,7}$   $P = 0.32$ ; y *P. monensis*  $F_{1,7} = 0,53$   $P = 0.50$ ). Las semillas de *L. rupestris* y *P. monensis* iniciaron germinación con todos los hongos, mientras que en *E. ramosum* la germinación se indujo con todos, menos dos hongos (Figura 5).





**Figura 3:** Germinación de semillas de *Tolumnia variegata* dos semanas después de la inoculación con diferentes hongos y con controles. Kc Medio Knudson C. Cell: Agar de celulosa sin hongo micorrizico.

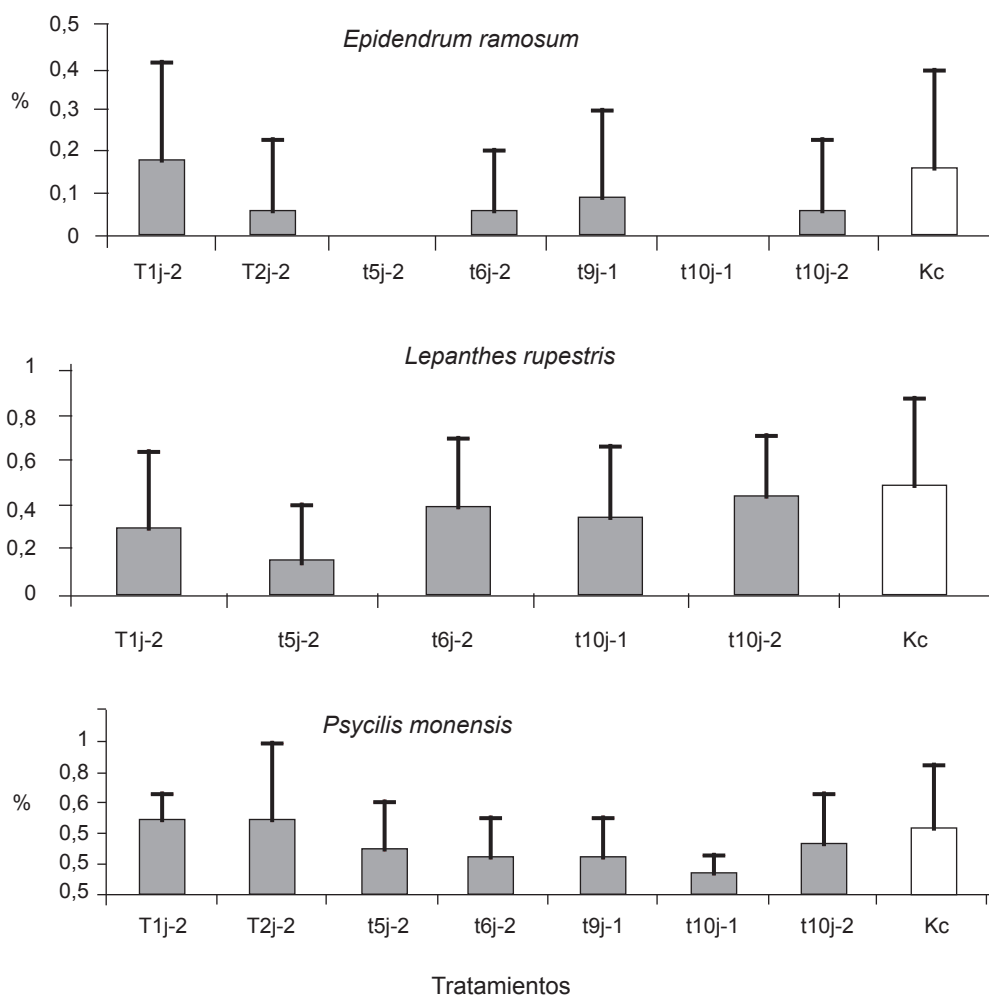


**Figura 4:** Germinación de semillas de *Tolumnia variegata* 2 meses después de la inoculación con diferentes aislados y con controles. Kc Medio Knudson C. Cell: Medio de celulosa sin hongo micorrizico.

### Discusión

Las semillas de *T. variegata* germinaron mejor en presencia de hongos aislados de *T. variegata* que en el medio de Knudson. Aunque los hongos micorrizicos no son utilizados frecuentemente para la germinación *in vitro* de

semillas de orquídeas epifitas, la utilización de cepas apropiadas de micorrizas podría mejorar el cultivo de estas plantas a partir de semillas. No obstante, los hongos micorrizicos aislados de *T. variegata* no fueron tan benéficos para inducir la germinación de otras



**Figura 5:** Germinación de semillas de *Epidendrum ramosum* (A), *Lepanthes rupestris* (B), y *Psychilis monensis* (C) 2 semanas después de la inoculación con diferentes hongos micorrizicos con controles. Kc Medio Knudson C.

especies de orquídeas epifitas. Los datos en este estudio sugieren que las relaciones entre orquídeas epifitas y sus micorrizas son más específicas de lo que se había creído (Arditti et al. 1990). Dicha especificidad puede complicar la aplicación comercial de estos hongos en el cultivo de orquídeas, porque implica que cada especie necesita un grupo particular de ellos. Se precisa más investigación para identificar los simbiosistas naturales asociados con las especies de importancia económica y con las especies amenazadas, con el fin de mejorar las condiciones de cultivo a partir de semillas. Esta meta se facilitaría mediante la creación y el análisis *in vitro* de un banco de cepas micorrizicas de orquídeas y la evaluación de los efectos en la germinación de diferentes especies de orquídeas. Estos

resultados permitirán el aprovechamiento sostenible de un recurso importante en la floricultura, como lo son las orquídeas epifitas tropicales.

La germinación simbiótica de semillas de orquídeas también tiene otra ventaja sobre la germinación asimbiótica. Los medios de cultivo para germinación asimbiótica (como el medio de Knudson C que se utilizó en este ensayo) son ricos en azúcares y nutrientes, y las plántulas tardan meses para establecerse. Esta combinación pone las plántulas susceptibles a la contaminación fúngica. La inoculación de las semillas con un hongo micorrizico contribuye a evitar el crecimiento de otros hongos que las pueden contaminar (Porrás and Bayman, 2007).

## Conclusiones

Las técnicas de germinación simbiótica utilizando hongos micorrízicos de orquídeas son una alternativa para la germinación de semillas de estas plantas epifitas tropicales. En comparación con la utilización de métodos asimbióticos, el uso de simbiontes naturales puede ser más eficiente si se cuenta con los hongos apropiados para la germinación. Desafortunadamente, aún se conoce muy poco sobre cuáles son los simbiontes más apropiados para las especies de orquídeas con importancia económica y por tanto es recomendable hacer estudios más profundos que permitan identificar los mejores hongos para estimular la germinación *in vitro* de dichas especies.

## Agradecimiento

A L. Amaury Castro, Angélica Carrillo, Jesyca García, Laura Fidalgo, Paola Pabón, Andrea Porras y Sergio Rocafort por su ayuda en el laboratorio. Nicola S. Flanagan nos brindó un inmenso apoyo. Esta investigación fue apoyada por una beca de NSF-EPSCoR (NSF grant EPS-9874782) y de NASA-IRA otorgada a J. T. Otero.

## Referencias

- Ackerman, J. D. 1995. An orchid flora of Puerto Rico and the Virgin Islands. Mem. NY Bot. Garden. 73:1 - 203
- Arditti, J. 1992. Fundamentals of orchid biology. New York, John Wiley & Sons. 691 p.
- Arditti, J., Ghani, A. K. A. 2000. Tansley Review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. New Phytol. 145:367 - 421.
- Arditti, J., Ernst R., T. W. Yam, C. Glabe. 1990. The contributions of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: a speculative review. Lindleyana 5:249 - 255.
- Bernard, N. 1899. Sur la germination du *Neottia nidus-avis*. C R Hebd. Seances Acad. Sci. 128:1253 - 1255.
- Ewel, J.J.; J. L. Whitmore. 1973. The ecological life zones of Puerto Rico and U.S. Virgin Islands. Forest Service Research Papers ITF 18. USDA, Institute of Tropical Forestry, Río Piedras, Puerto Rico. 74 p.
- Knudson, L. 1921. La germinación no simbiótica de las semillas de orquídeas. Bol Soc Esp Hist Nat. 21:250 - 260.
- Otero J. T., Ackerman J. D., Bayman P., 2002. Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-like fungi from tropical orchids. Am. J. Bot. 89:1852 - 1858.
- Otero J. T., Ackerman J. D., & Bayman P. 2004. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. Mol. Ecol 13:2393 - 2404.
- Otero J. T., Bayman P., Ackerman J. D., 2005. Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata in vitro*: The potential for natural selection. Evol. Ecol. 19:29 - 43.
- Otero J.T., Flanagan N., Herre E. A., Ackerman J. D., Bayman, P. 2007. Widespread mycorrhizal specificity correlatos to mycorrhizal function in the neotropical epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). Am. J. Bot. 94:1944 - 1950.
- Rasmussen H. N. 1995. Terrestrial orchids: From seeds to mycotrophic plants. Cambridge: University Press. 444 p.
- Porras A, P Bayman, 2007. Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity, and effects on seed germination and plant growth. Mycol. 99:510 - 525.
- Sneh, B., Burpee L., Ogoshi. A.1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. St. Paul Minnesota, USA: Amer. Phyt. Soc. 133 p.
- Stenberg, M.L. Kane. M. E.1998. *In vitro* seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. *erytrinoides*, an endangered Florida orchid. Lindleyana 13:101 - 112