

OBTENCION DE PLANTULAS DE *CHLORAEA CRISPA* A PARTIR DE SEMILLAS MICORRIZADAS



Chloraea crispa seedlings obtained with mycorrhizal fungus

Mersey. L., Cisternas M.A., Besoain X. A. y Verdugo G.S.
Facultad de Agronomía Pontificia Universidad Católica de Valparaíso
Casilla 4D Quillota Chile
Proyecto FIA C98-1-A-022



RESUMEN:

Chloraea crispa Lindley es una orquídea nativa de Chile, se encuentra distribuida en una amplia zona territorial que abarca desde Concepción a Llanquihue (VIII a X regiones). Su estado de conservación no ha sido clasificado, sin embargo se considera amenazada por labores de manejo forestal (Novoa et al 2003) Por otra parte esta especie presenta muy buenas características como flor cortada (Uribe, 2000 y Rendich, 2001), por lo cual se hacen esfuerzos por propagarla comercialmente.

Las semillas de orquídeas se caracterizan por ser semillas pequeñas y livianas. Están formadas por una testa, que encierra a un embrión de tan solo unas 100 a 200 células, (Mitchell, 1989) por lo tanto es absolutamente necesario la simbiosis con un hongo micorriza (Mckendrich, 2002).

Se evaluaron en Quillota, V región, Chile, cinco hongos aislados por Garrido (2002) desde plantas de *Chloraea crispa* creciendo en su ambiente natural, mas *Rhizoctonia solani* proveniente de *Lycopersicon esculentum* Mill mediante la técnica de inoculación con agar avena se determinó las etapas descritas por Mitchell (1989) para definir una germinación exitosa a partir de la etapa cuatro. Sólo uno de los hongos, alcanzó dicha etapa constituyendo protocormos que posteriormente fueron plantados en suelo. El hongo micorriza aislado corresponde al género *Rhizoctonia*.

Proyecto FIA C98-1A -22

INTRODUCCION:

En Chile, en general las orquídeas son especies escasas y de poblaciones reducidas que deben protegerse, evitando romper sus ciclos o alterar sus lugares de origen (Riedemann y Aldunate, 2000). *Chloraea Crispa* Lind., es una orquídea terrestre endémica de Chile (Correa, 1969), que presenta características comerciales destacables para ser utilizada como flor de corte (Rendich, 2001).

Muchas de las orquídeas terrestres, son deseables hortícolamente, pero son difíciles de propagar (Mitchell, 1989). Esto se debe a que para desarrollarse necesitan establecer una relación simbiótica con hongos micorrícicos (Correa, 1969; Cuya, 2002).

Objetivos:

- Evaluar la capacidad simbiótica de seis hongos en la germinación de *Chloraea crispa* Lind.
- Determinar el efecto de la desinfección de las semillas en la germinación simbiótica del hongo seleccionado.

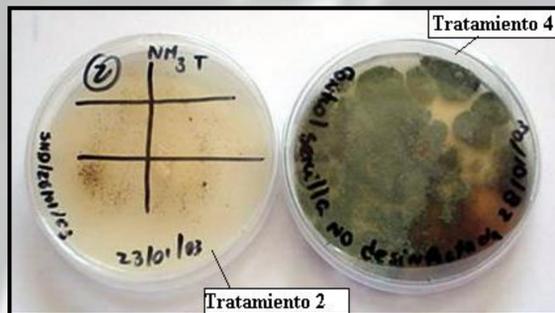


FIGURA 1. Siembra de semillas de *Chloraea crispa* sin desinfectar. La placa del tratamiento 2, fue inoculada con el hongo NM3, mientras que la placa del tratamiento 4 contenía agar avena, observándose en este último contaminación fungosa.

MATERIALES Y METODOS:

Ensayo 1. Selección de un hongo micorrícico, para la germinación de semillas de *Chloraea crispa*.

Se evaluaron seis hongos, cinco provenientes de orquídeas nativas y uno proveniente de plantas cultivadas. Los 11 hongos M2, NM1, NM2, NM3 y NM4 se aislaron en la Universidad de Concepción desde plantas de *Chloraea crispa* y *Chloraea gaviola*. Se incluyó un aislado fúngico proveniente de raíces de una planta cultivada de *Lycopersicon esculentum* con la sigla 618.

Para evaluar el efecto micorrícico y la especificidad de seis hongos sobre el proceso de germinación, se realizó una siembra *in vitro* de semillas del género *Chloraea* sobre placas que contenían agar avena inoculado con estos hongos.

Cinco semanas tras la inoculación, se sembraron tres lotes de 0.5 mg. de semillas de *Chloraea crispa* en cada placa.

La selección del hongo micorrícico se realizó en base a observaciones visuales diarias del efecto que cada hongo tuvo en el proceso de germinación (cuadro 1). Se consideró una micorrización exitosa cuando se alcanzó al menos la etapa tres planteadas por Mitchell (1989).

Ensayo 2. Desinfección de semillas de *Chloraea crispa* y sus efectos en la germinación simbiótica.

Las semillas fueron sacadas de la cámara a 4 °C, y se pesaron lotes de 2 mg ± 0.1 mg en una balanza de precisión y luego fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 2% más Tween 80, durante 3 minutos a través del método el tubo planteado por Batty (2001).

El efecto de la desinfección de las semillas, se evaluó contando bajo lupa el número de semillas germinadas por placa para cada tratamiento (Cuadro 2), es decir aquellas que al menos habían llegado a la etapa 1 de germinación descrita por Mitchell (1989), (Figuras 1, 2 y 3).

CONCLUSIONES:

Se logró establecer un protocolo de germinación simbiótica, en semillas de *Chloraea crispa*, y a través de él se obtuvieron plántulas a partir de semillas (Figura 4).

Se seleccionó el hongo NM3, después de evaluar sus efectos en la germinación simbiótica de semillas de *Chloraea crispa*. El hongo pertenece al género *Rhizoctonia* y fue aislado originalmente desde plantas de *Chloraea crispa*.

Se observó que en semillas de *Chloraea crispa*, un 2% de hipoclorito de sodio por 3 minutos, es una concentración y tiempo alto de desinfección, y aún cuando los resultados son adecuados se podría realizar desinfecciones con dosis y tiempos menores.

REFERENCIAS:

- Batty, M. and Brundett, M. 2001. Orchid conservation techniques manual. First International Orchid Conservation Congress-Training Course. Australia. September 2001. sp.
- Correa, M. 1969. *Chloraea*, género sudamericano de Orchidaceae. Buenos Aires. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 499p.
- Cuya, M. 2002. Micropropagación de las semillas de orquídeas. (on line). www.lamolinaedu.pe/Facultad/Agronomia/horticultura/propagacion/biotecnologia/cuya_resumen.htm
- Garrido, N. 2002. Evaluación y multiplicación de especies de orquídeas nativas para establecer las bases de un cultivo comercial en la VIII región de Chile. FIA C98-1-A-022. Informe 5.
- Mckendrick, S. 2002. Manual para la germinación in vitro de orquídeas. Copyright, Almería 29,30, 31 de mayo de 1995.pp181 - 190 2000, Ceiba Foundation for Tropical conservation. 17p.
- Mitchell, R.. 1989. Growing hardy orchids from seeds at Kew. Plantsman. 11(3): p. 152 – 169.
- Novoa, P., Espejo, J & M. Cisternas. 2003. Orquídeas chilenas. Chloris chilensis. <http://www.chlorischile.cl>
- Rendich, A. 2001. Evaluación de crecimiento y floración de orquídeas nativas de la especie *Chloraea crispa*. Taller de Licenciatura. Ing.Agr. Quillota, Chile, Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. 81p.
- Riedemann, P y Aldunate, G. 2001. Flora nativa de valor ornamental. Editorial Andrés Bello. Chile. 566p.
- Uribe, E. 2000. Descripción del ciclo fenológico de orquídeas nativas pertenecientes al género *Chloraea* y registro de características de interés agronómico de la especie. Taller de licenciatura. Quillota, Chile. Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía.65p



FIGURA 2. Germinación de semillas no desinfectadas de *Chloraea crispa*, dos semanas postsiembra, en un medio agar avena inoculado con el hongo NM3. Se pueden diferenciar semillas no germinadas (polvo café), de semillas germinadas (blancas), formando protocormos.

RESULTADOS:

Cuadro 1 Efecto de seis hongos, sobre las etapas de germinación de semillas de *Chloraea crispa*.

Hongos evaluados	Etapas de germinación según Mitchell (1989)
M2	0
NM1	0
NM2	1
NM3	4
NM4	1
618	0

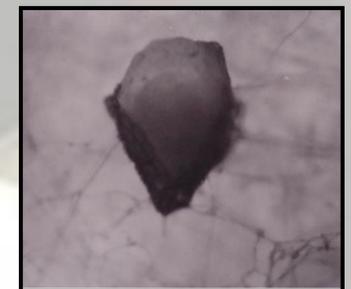


FIGURA 3. Observación bajo lupa estereoscópica, de una semilla de *Chloraea crispa*, siete días post siembra. Se puede observar la introducción del micelio del hongo NM3 al interior de la semilla

Cuadro 2. Cantidad de semillas de *Chloraea crispa* germinadas a partir de 2 mg ± 0.1 mg. Promedio de cuatro observaciones.

Tratamiento	Semillas germinadas
T1: Semillas desinfectadas sembradas sobre NM3	176
T2: Semillas no desinfectadas, sembradas sobre NM3	64
T3: Semillas desinfectadas sembradas sobre placa sin inocular	0
T4: Semillas no desinfectadas sembradas sobre placa sin inocula	0

* 1 mg de semilla de *Chloraea crispa* contiene 540 ± 92 unidades



FIGURA 4. Plantulas de *Chloraea crispa* obtenidas a partir de semillas inoculadas con el hongo NM3.