

Colonización micorrícica en tres especies de Orquídeas nativas de las Sierras de Córdoba, Argentina

Carlos Urcelay *, Rosina Pasquini **, Silvina Cánovas ** & Verónica Liébana **

* *Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV). CONICET-Universidad Nacional de Córdoba, Casilla de Correo 495, 5000 Córdoba, Argentina. E-mail: curcelay@imbiv.unc.edu.ar. Becario Interno de Formación de Postgrado de CONICET.*

** *Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.*

Resumen

Urcelay, C., R. Pasquini, S. Cánovas & V. Liébana. 2005. Colonización micorrícica en tres especies de Orquídeas nativas de las Sierras de Córdoba, Argentina. *Kurtziana* 31 (1-2): 51-57.

Se estudiaron las raíces de *Cyclopogon elatus*, *Habenaria hexaptera* y *Pelexia bonariensis* con el objetivo de investigar la presencia de simbiontes fúngicos radicales en individuos adultos. Todos los individuos de las tres especies estudiadas presentaron colonización micorrícica orquidoide perteneciente al tipo tolipofágico. Además, se observaron células moniliformes en las raíces de dos individuos de *H. hexaptera*, que previamente habían sido observadas sólo en cultivos axénicos. La presente contribución constituye el primer trabajo donde se cita y describe en detalle la colonización de los simbiontes fúngicos presentes en las raíces de Orquídeas nativas en Argentina.

Palabras clave: *Cyclopogon elatus*, *Habenaria hexaptera*, *Pelexia bonariensis*, micorrizas orquidoideas, tolipofagia.

Abstract

Urcelay, C., R. Pasquini, S. Cánovas & V. Liébana. 2005. Mycorrhizal colonization in three native orchids from Córdoba mountains, Argentina. *Kurtziana* 31 (1-2): 51-57.

The roots of *Cyclopogon elatus*, *Habenaria hexaptera* and *Pelexia bonariensis* were examined in order to elucidate the presence of fungal root symbionts in adult plants. All the individuals of the three species showed orchid mycorrhizal colonization belonging to the histological type known as tolypophagy. In addition, two individuals of *H. hexaptera* roots showed moniliform fungal cells, which have only been previously observed in axenic cultures. This is the first report and detailed description of fungal symbionts colonization in roots of orchid species in Argentina.

Key words: *Cyclopogon elatus*, *Habenaria hexaptera*, *Pelexia bonariensis*, orchid mycorrhizas, tolypophagy.

Introducción

Las Orquidáceas constituyen una de las familias de plantas más numerosas, con aproximadamente 20.000 especies (Dressler, 1993). Una de las características más importantes de esta familia es que poseen semillas muy pequeñas,

sin reserva y embrión no diferenciado que no se desarrolla si no es colonizado por hifas de hongos pertenecientes al Phylum *Basidiomycota*. Estos hongos pueden estar involucrados en la transferencia de hidratos de carbono (que provienen de la materia orgánica o de una planta clorófila) y nutrientes necesarios para su

germinación y desarrollo en el estadio de plántula (Leake, 1994; Smith & Read, 1997). En estado adulto, la relación entre la planta y el hongo continúa en las raíces que son colonizadas o infectadas por las hifas fúngicas y es ampliamente conocida como micorriza orquidoide. En las especies aclorófilas la relación es obligatoria durante todo el ciclo de vida de la planta (Leake, 1994) mientras que en las autótrofas la naturaleza del beneficio proporcionado por los simbiontes fúngicos a la planta adulta no se conoce con certeza (Smith & Read, 1997; Rasmussen, 2002). Al observar las estructuras fúngicas en el sistema radical se pueden reconocer dos tipos histológicos de colonización: tolipofagia (tolypophagy, sensu Rasmussen, 1995), que constituye el más distribuido y ptiofagia (ptyophagy, sensu Rasmussen, 1995) conocida hasta el momento en numerosas especies del género *Gastrodia* R. Br. y en *Lecanorchis javanica* Bl.

Ptiofagia es un tipo aparentemente raro fuera de los trópicos y ha recibido menor atención que la tolipofagia; se caracteriza por la deformación y lisis de los ápices de las hifas intracelulares donde se presume que ocurre la liberación del contenido celular fúngico dentro de la célula de la planta. En el caso de la tolipofagia, el endófito fúngico forma enrolamientos hifales bien definidos, conocidos como pelotones o rulos, en la célula infectada antes de que la lisis tenga lugar. Cuando se produce la lisis del pelotón, es cuando se produciría la transferencia de los nutrientes. La tolipofagia se caracteriza por la proliferación de rulos en las células radicales de un determinado sector de la raíz, seguidos por la lisis de las hifas que forman los rulos que da lugar a estructuras amorfas; luego, las células vegetales son reinfectadas (Rasmussen, 1995). La colonización se desarrolla principalmente en las raíces y en menor medida en tubérculos o tuberosidades radicales (Smith & Read, 1997).

A pesar de que la familia Orchidaceae está incluida en el apéndice II y numerosas especies en el apéndice I de CITES (Convention on international trade in endangered species: http://www.cites.org/eng/append/I&II_0700.shtml) y de la importancia que tiene la micotrofia en la biología de este grupo de plantas, no existen estudios

relacionados con los simbiontes fúngicos presentes en raíces de Orquídeas nativas de nuestro país (Urcelay & Domínguez, 2002).

En el presente trabajo se estudió el sistema radical de *Cyclopogon elatus* (Sw.) Schltr., *Habenaria hexaptera* Lindl. y *Pelexia bonariensis* (Lindl.) Schltr. todas nativas y además presentes en las Sierras de Córdoba (Cocucci, 1954). Los objetivos fueron determinar en qué partes del sistema radical se presentan las estructuras fúngicas, describirlas y determinar el tipo histológico al que pertenecen.

Material y Métodos

Área de estudio

El sitio de estudio se encuentra en el establecimiento "Hayke" km 50, ruta Provincial n° 14, Dpto. Punilla, Provincia de Córdoba, en el piso de un bosque de *Pinus* spp., Distrito Chaqueño Serrano de las Sierras Grandes de Córdoba (Luti et al., 1979). El área de estudio está ubicada a 880 m.s.m. y la precipitación media anual es de 720 mm, concentrada principalmente en el verano. El invierno es relativamente frío, con temperaturas medias anuales de 14,55° C (de Fina, 1992).

La recolección del material de estudio se realizó en otoño (7 de abril de 2002) ya que en regiones con clima estacional como el del área de estudio, la micotrofia depende de la provisión de materia orgánica en el suelo que alcanza un desarrollo óptimo en otoño con la caída de las hojas (Rasmussen, 1995). El material se conservó en heladera a 4° C hasta su procesamiento.

Material estudiado

Se estudiaron tres especies de Orquídeas nativas autótrofas adultas en estado vegetativo (Cocucci, 1954):

Cyclopogon elatus (12 individuos):

En nuestra provincia se distribuye en las Sierras Chicas y en regiones aledañas. Son hierbas terrestres, perennes, con raíces tuberosas, carnosas (Fig. 1 A).

Habenaria hexaptera (12 individuos):

Es una especie argentina descrita originariamente para las Sierras Grandes de Córdoba. Son hierbas terrestres, perennes, con tuberosidades radicales subterráneas y raíces largas y carnosas (Fig. 1 B).

Pelexia bonariensis (2 individuos):

Es la única representante del género que habita en la provincia de Córdoba. Son hierbas terrestres, perennes, con raíces tuberosas, carnosas, unidas a un corto rizoma (Fig. 1 C).

Métodos de clarificación y tinción.- En *Cyclopogon elatus* se realizaron cortes transversales en la zona proximal y distal de las raíces tuberosas. En *Habenaria hexaptera* los cortes fueron efectuados transversalmente en el tubérculo y en forma longitudinal por las raíces largas. Los cortes por la raíz tuberosa de *Pelexia bonariensis* fueron realizados en forma transversal en la zona proximal, media y distal.

Durante la semana de haber sido recolectadas, las raíces y tubérculos radicales fueron separados del suelo adherido y lavados. La clarificación se realizó con una solución de hidróxido de potasio al 20%, acidificado con ácido clorhídrico al 10% y teñido con una solución de ácido láctico y azul de anilina al 0,05%, según el método de Grace & Stribley (1991).

Los cortes de las raíces teñidas fueron montados en alcohol polivinílico (Omar et al., 1979) y observados usando microscopio óptico Kyowa, usando objetivos estándar (x10-x40-x100). Las fotografías fueron tomadas usando un microscopio Axiophot Zeiss con objetivos de contraste de interferencia diferencial.

Cortes vegetales de referencia fueron herborizados y depositados en el Herbario del Museo Botánico de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba (CORD).

Resultados

Las tres especies estudiadas presentaron colonización micorrícica orquídoide del tipo histológico tolipofágico. En *Cyclopogon elatus*

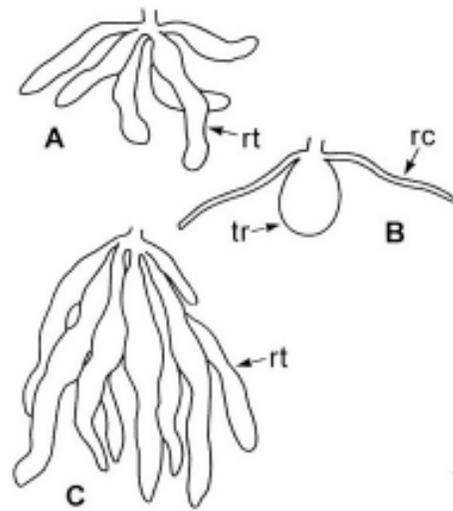


Fig. 1.- Esquema del sistema radical de: A: *Cyclopogon elatus*; B: *Habenaria hexaptera*; C: *Pelexia bonariensis*. Abreviaturas: *rt*, raíces tuberosas; *tr*, tuberosidades radicales; *rc*, raíces carnosas.

se observó la presencia de pelotones teñidos, distribuidos homogéneamente (Fig. 2 A) o ubicados en determinados sectores del cortex. Estos pelotones se observaron en su gran mayoría digeridos en forma de un contenido intracelular amorfo y, unos pocos, presentaron hifas con septos simples de 2,8-3 mm de diámetro. En el velamen se observaron hifas teñidas con paredes delgadas o castañas con paredes engrosadas, con septos simples, ramificadas de 1,2-6,4 mm de diámetro, en algunos casos penetrando a la raíz por pelos radicales.

Las tuberosidades radicales de *Habenaria hexaptera* presentaron pelotones hifales en estadios finales de digestión, formando masas teñidas amorfas e irregulares distribuidas en la corteza. En algunos individuos se observaron hifas fibuladas intensamente teñidas con paredes engrosadas de 4,8-6,4 mm de diámetro. También se observaron hifas castañas con septos simples y paredes engrosadas de 6,4-9,7 mm de diámetro. Dos de los individuos estudiados mostraron hifas moniliformes de 9,7-11,2 mm de diámetro penetrando las células de la corteza. En la periferia del tubérculo se vieron hifas fibuladas de 3,6-6,1 mm de diámetro atravesan-

do el velamen entre las células, que en algunos extremos de su recorrido mostraron septos simples y formaron esclerocios.

En la raíz carnosa de *Habenaria hexaptera* se encontraron hifas fúngicas formando pelotones o rulos en la corteza (Fig. 2 B). Se observaron dos tipos de hifas involucradas en estas estructuras: 1) Hifas con septos simples, cuyo diámetro oscila entre 2,4-4,8 μm , que forman pelotones y se tiñen de color azul claro. Este tipo hifal puede dar lugar a células globosas moniliformes, de 5,5-11,0 μm de diámetro y coloración más clara que la hifa que le dio origen. (Fig. 2 C). 2) Hifas fibuladas de 2,4-3,6 μm de diámetro que se tiñeron intensamente. Los pelotones formados por este tipo hifal presentan también una coloración más intensa. La localización de los pelotones en la corteza no siguió un patrón definido y varió de un individuo a otro. En ocasiones se concentraron en uno de los lados de la raíz, en la corteza radical, entre el sistema vascular y el velamen, o se localizaron en la región proximal y distal de la raíz, estando ausentes en la zona central; en otras se observó toda la corteza colonizada. En un mismo individuo los pelotones se encontraron en distintos estadios de desarrollo, desde jóvenes intensamente teñidos y compactos, a viejos formando estructuras laxas, desorganizadas, de coloración más clara; también el grado de digestión varió en los distintos individuos. Además se encontraron, en menor proporción, hifas de color castaño con septos simples de 2,7-5,5 μm de diámetro que, en ocasiones, originaron esclerocios en la corteza.

En las raíces tuberosas de *Pelexia bonaerensis* los pelotones se encontraron concentrados hacia la periferia y pudieron apreciarse hifas con septos simples intensamente teñidas. Tanto en el sector proximal como en el distal de la raíz se observaron pelotones en diferentes estados de digestión, donde los pelotones jóvenes se encuentran por fuera de los pelotones en vías de digestión (Fig. 2 D). Las hifas que forman los pelotones se tiñeron intensamente; las que interconectan pelotones jóvenes tienen un diám. de 2,4 y 4,8 μm y presentan constricciones cuando pasan de una célula a otra (Fig. 2 E). Cuando los pelotones se encon-

traron en estado de digestión o degradación no se observaron las hifas que interconectan las células radicales (Fig. 2 F). Por otro lado, se observaron hifas con septos fibulados, de 2,8 y 5,5 μm de diámetro, entre las células del velamen que no formaron ninguna estructura, ni penetraron a la raíz más allá del mismo. En ocasiones se las observó penetrando a la raíz a través de pelos radicales.

Discusión

En el presente trabajo se describen las estructuras fúngicas presentes en el sistema radical de especies nativas de Orquídeas y constituye el primer estudio realizado en nuestro país relacionado a las micorrizas orquidoides. Las tres especies mostraron una colonización del tipo histológico tolipofágico que es el más distribuido en la familia Orchidaceae (Rasmussen, 1995).

Según Harley (1959) las Orquídeas autótrofas adultas presentan baja colonización fúngica, sin embargo, nuestras observaciones revelan que la mayoría de los individuos de las tres especies estudiadas están intensamente colonizadas. Las hifas en el velamen, que no penetran más allá de éste y no llegan a formar ningún tipo de estructura micorrícica en el sistema radical, pertenecerían a hongos saprófitos que no participan de ninguna asociación simbiótica.

Las especies estudiadas mostraron diferencias en el desarrollo de las estructuras micorrícicas presentes en la corteza radical. En las tres especies se observaron pelotones en estado de digestión avanzado, pero en *H. hexaptera* y *P. bonaerensis* también se observaron pelotones en desarrollo. Estas observaciones sugieren que la actividad del micelio fúngico no sólo dependería de la cantidad de materia orgánica en el suelo (Rasmussen, 1995), sino también de la fenología y estado fisiológico de la planta hospedante.

En *H. hexaptera* la colonización en los tubérculos es aparentemente menor que en las raíces largas y sólo se aprecian pelotones muy digeridos en los mismos; esto ha sido observado previamente en otras especies (Smith & Read,

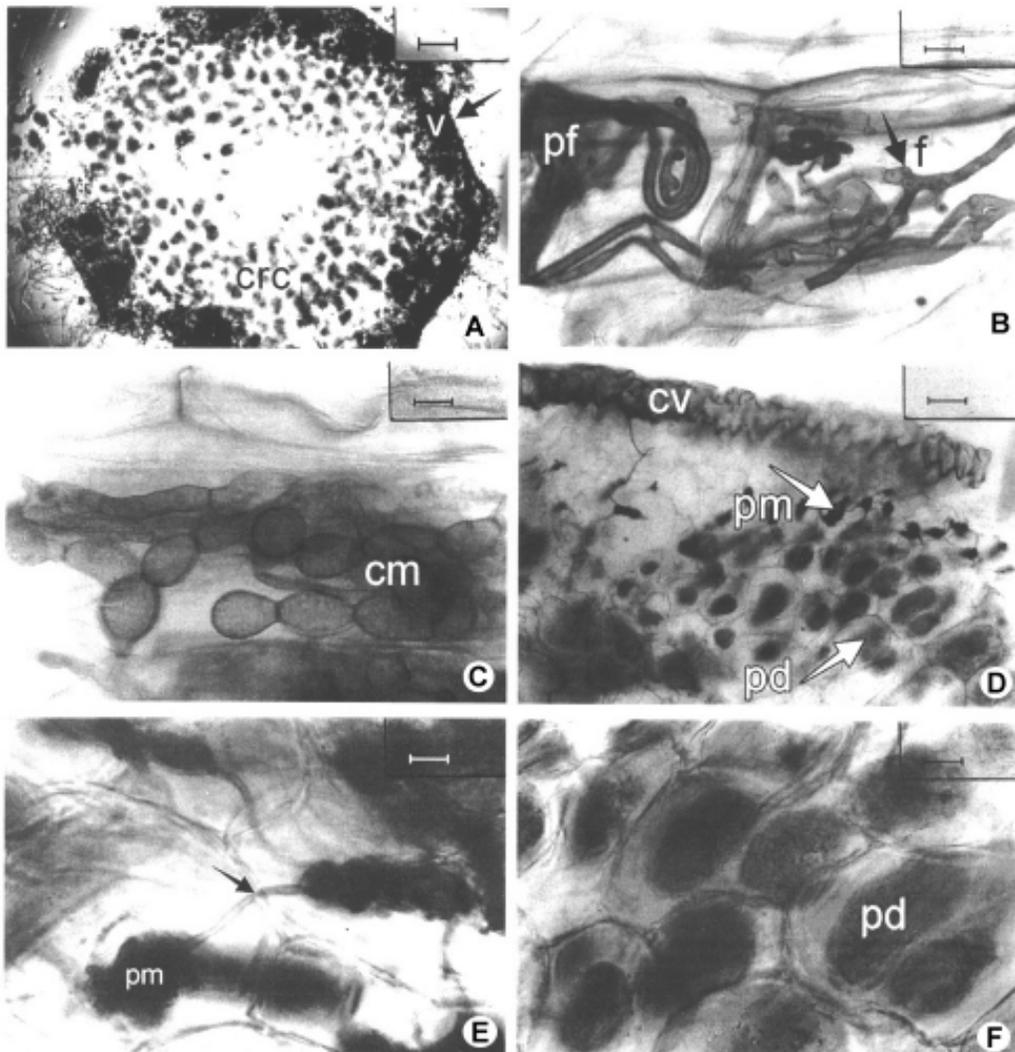


Fig. 2.- Estructuras fúngicas en el sistema radical. A: corte transversal de tuberosidad radical de *C. elatus*; B: corte longitudinal de raíz carnosa de *H. hexaptera*; C: corte longitudinal de raíz carnosa de *H. hexaptera*; D: corte transversal de tuberosidad radical de *P. bonariensis*; E: corte transversal de tuberosidad radical de *P. bonariensis*. Detalle de un pelotón maduro. La flecha señala la constricción de la hifa fúngica al pasar de una célula radical a otra; F: corte transversal de tuberosidad radical de *P. bonariensis*. Detalle de D. Abreviaturas: *crc*, corteza radical colonizada por simbiontes fúngicos; *v*, velamen; *pf*, pelotón hifal en formación; *f*, fíbula hifal; *cm*, células hifales moniliformes; *cv*, células del velamen; *pm*, pelotón maduro; *pd*, pelotón en degradación; *pm*, pelotón maduro; *pd*, pelotones en degradación. Escalas: A = 250 μ m, B y C = 8 μ m, D = 80 μ m, E = 12,5 μ m, F = 25 μ m.

1997) y podría estar relacionado a que las raíces largas estarían más involucradas en la absorción de nutrientes que las raíces tuberosas. La presencia de pelotones en diferentes estados de desarrollo, principalmente jóvenes, observados en *H. hexaptera* y *P. bonariensis* sugieren una

activa interacción entre los simbiontes fúngicos y las plantas en esta época del año. La heterogénea distribución de las estructuras micorrícicas en diferentes sectores del sistema radical es una característica observada en otras especies de Orquídeas (Harley, 1959).

En las tres especies se observaron hifas fúngicas con septos simples pero en *H. hexaptera* se observaron, además, hifas con septos fibulados teñidos intensamente, lo que indicaría la presencia de más de una especie fúngica involucrada en la simbiosis micorrícica. En *H. hexaptera* también se observaron células hifales moniliformes en ambos tipos de raíces. Estas estructuras son típicas del complejo anamórfico *Rhizoctonia* que han sido generalmente observadas en cultivos axénicos del anamorfo fúngico (Tu & Kimbrough, 1975; Currah et al., 1987; Salmia, 1988; Zelmer & Currah, 1995). Hasta nuestro conocimiento es la primera vez que se observan estas estructuras en raíces recolectadas a campo. Las simbiosis fúngicas pertenecientes al género *Rhizoctonia* han sido citados en numerosas especies de Orquídeas (Harley, 1959; Warcup & Talbot, 1966, 1967, 1971, 1980; Selosse et al., 2002). En el área de estudio la presencia de estructuras pertenecientes al tipo *Rhizoctonia* ha sido previamente observada en *Gaultheria poeppigii* DC., Ericaceae (Urcelay, 2002) pero su función no es conocida.

La función de los simbiosis micorrícicos en raíces de Orquídeas clorófilas adultas no ha sido claramente determinada (Smith & Read, 1997). En algunos casos se la ha relacionado a la obtención de nitrógeno y fósforo (Alexander & Hadley, 1983, 1984). Debido a que el sistema radical de las especies estudiadas comprende raíces tuberosas y raíces gruesas con escasa capacidad de explorar los intersticios del suelo, cabe especular sobre el posible rol de los simbiosis fúngicos en la obtención de nutrientes. En este sentido, el estudio de la colonización a lo largo de la ontogenia de la planta y en diferentes estaciones podría ser una primera aproximación debido a que las diferentes demandas nutricionales que tienen las plantas varían de acuerdo a la etapa del crecimiento y la fenología. Además, sería deseable determinar con precisión la identidad de las especies fúngicas involucradas (por ej. a través de técnicas moleculares) para comprender las posibles relaciones filogenéticas y evolutivas entre los simbiosis fúngicos que colonizan las Orquídeas nativas.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración de la Dra. Alicia Sérsic y el Dr. Andrea Cocucci en la identificación de las especies de Orquídeas y a la Prof. Diana Abal-Solís por la asistencia en la elaboración de las figuras y a dos revisores que realizaron aportes y contribuyeron a la versión final del manuscrito. También se agradece el apoyo financiero de SECyT-UNC (subsidio n° 150-2001).

Referencias bibliográficas

- Alexander, C. & G. Hadley. 1983. Variation in symbiotic activity of *Rhizoctonia* isolates from *Goodyera repens* mycorrhizas. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 80: 99-106.
- & ———. 1984. The effect of mycorrhizal infection of *Goodyera repens* and its control by fungicide. *New Phytol.* 97: 391-400.
- Cocucci, A. E. 1954. Sinopsis de las especies cordobesas de Orchidaceae. *Revista Fac. Ci. Exact., Ser. Ci. Nat.* 2: 1-46.
- Currah, R. S., L. Sigler & S. Hambleton. 1987. New records and new taxa of fungi from the mycorrhizae of terrestrial orchids. *Canad. J. Bot.* 65: 2473-2482.
- de Fina, A. L. 1992. *Aptitud agroclimática de la República Argentina*. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, Buenos Aires.
- Dressler, R. L. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press, Portland.
- Grace, C. & D. P. Stribley. 1991. A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* 95 (10): 1160-1162.
- Harley, J. L. 1959. *The biology of micorrhiza*. University Press Aberdeen, Leonard Hill, London.
- Leake, J. R. 1994. The biology of myco-heterotrophic 'saprophytic' plants. *New Phytol.* 127: 171-216.
- Luti, R., M. Solís, F. M. Galera, N. Muller, N. Berzal, M. Nores, M. Herrera & J. C. Barrera. 1979. Vegetación, en J. Vázquez, M. Miatello & M. Roque (eds.). *Geografía Física de la Provincia de Córdoba*, pp. 297-368. Boldt, Buenos Aires.

- Omar, M. B., L. Bolland & W. A. Heather. 1979. A permanent mounting medium for fungi. *Bull. Brit. Mycol. Soc.* 13: 31-32.
- Rasmussen, H. N. 1995. *Terrestrial Orchids - from Seed to Mycothrophic Plant*. Cambridge University Press, Cambridge.
- 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Pl. & Soil* 244: 149-163.
- Salmia, A. 1988. Endomycorrhizal fungus in chlorophyll-free and green forms of the terrestrial orchid *Epipactis helleborine*. *Karstenia* 28: 3-18.
- Selosse M.-A., M. Weiã, J.-L. Jany & A. Tillier. 2002. Communities and populations of sebacinoïd basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Molec. Ecol.* 11: 1831-1844.
- Smith S. E. & D. J. Read. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, San Diego, California.
- Tu, C. C. & J. W. Kimbrough. 1975. Morphology, development, and cytochemistry of the hyphae and sclerotia of species of *Rhizoctonia* complex. *Canad. J. Bot.* 53: 2282-2296.
- Urcelay, C. 2002. Co-occurrence of three fungal root symbionts in *Gaultheria poeppigii* DC. from Central Argentina mountains. *Mycorrhiza* 12: 89-92.
- & L. Domínguez. 2002. Biología de las Orquídeas: ¿es necesario considerar los hongos micorrícicos? *Actas del I Congreso Argentino de Orquideología y Conservación*. Editado en CD.
- Warcup, J. H. & P. H. B. Talbot. 1966. Perfect states of some *Rhizoctonia*'s. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 49: 427-425.
- & —— 1967. Perfect states of *Rhizoctonia*'s associated with orchids. *New Phytol.* 66: 631-641.
- & —— 1971. Perfect states of *Rhizoctonia*'s associated with orchids II. *New Phytol.* 70: 35-40.
- & —— 1980. Perfect states of *Rhizoctonia*'s associated with orchids III. *New Phytol.* 86: 267-272.
- Zelmer C. D. & R. S. Currah. 1995. *Ceratorhiza pernacatena* and *Epulorhiza calendulina* spp. nov.: Mycorrhizal fungi of terrestrial orchids. *Canad. J. Bot.* 73 (12): 1981-1985.

Original recibido el 4 de marzo de 2003;
aceptado el 29 de julio de 2003.