

Rescate, establecimiento y conservación de orquídeas en vías de extinción

Investigadora responsable: M.Sc. Ana Abdelnour Esquivel

Investigadora colaboradora: Licda. Annabelle Muñoz B.

Departamento de Biología

Resumen

*Con la acelerada destrucción de nuestros bosques, no sólo las especies arbóreas han sido afectadas, sino también muchas otras asociadas con estos ecosistemas. La pérdida de muchas especies de orquídeas nativas se ha incrementado por su colecta y comercialización indiscriminada desde sus hábitat naturales. Por lo tanto, un programa para su rescate, propagación masiva y conservación, era urgente para conservar su diversidad genética y hacerlas fácilmente disponibles para coleccionistas y público en general. El programa fue iniciado en 1995 y actualmente muchas especies como *Cattleya dowiana*, *C skinneri*, *C. aurantiaca*, *Lycaste bradeorum*, *L. skinneri*, *Trichocentrum*, *Trichopilia suavis*, *Oncidium escarvatum*, *O. istmanii* y *Encyclia cordillera*, pueden encontrarse en el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica.*

Abstract

With the accelerated destruction of our forests, not only tree species have been affected, but also many others associated with these ecosystems. Lost of many native orchid species have been enhanced by its indiscriminated collection from their natural habitats and commercialization. Therefore, a program for the rescue, mass propagation and conservation of some

*endangered and/or commercialized species was urgent to conserve the genetic resources and to make them easily available to collectionist and general public. The program was initiated in 1995 and at the present many species such as *Cattleya dowiana*, *C skinneri*, *C. aurantiaca*, *Lycaste bradeorum*, *L. skinneri*, *Trichocentrum*, *Trichopilia suavis*, *Oncidium escarvatum*, *O. istmanii* and *Encyclia cordillera*, can be found at the Biotechnology Research Center of the Costa Rica Institute of Technology.*

Definición del problema

La gran explotación de las orquídeas por los europeos se dio a partir de 1919, cuando el recolector Swainson recogió algunas especies exóticas y las envolvió con plantas de fuertes tallos y duro follaje, al parecer con poco o ningún valor. (Asociación Costarricense de Orquideología, 1973).

Un número apreciable de firmas comerciales encontró un excelente negocio en abastecer la demanda de nuevas especies y envió a diversos recolectores a localizar las que habían logrado popularizarse y a buscar otras nuevas que pudieran incrementar el interés por estas plantas y sus magníficas ganancias (Asociación Costarricense de Orquideología, 1973).

En este proceso, vastas zonas de las junglas tropicales fueron totalmente devastadas (Asociación Costarricense de Orquideología, 1973).

Las orquídeas se transformaron rápidamente en artículos de gran valor comercial y los mismos importadores comenzaron a darse cuenta de que esta explotación indiscriminada no podía continuar indefinidamente (Asociación Costarricense de Orquideología, 1973).

La selva tropical constituye un almacén de millares de especies de plantas que viven en estrecha interdependencia. Entre ellas, la mayoría de las orquídeas epífitas que nos interesan; sin bosques no puede haber orquídeas epífitas. A esta misma conclusión han llegado docenas de países tropicales desde la aparición de la pequeña y mortífera motosierra, que puede cortar un tronco de medio metro en menos de diez segundos. En la actualidad la motosierra manual es un instrumento tan eficaz comparado con el hacha y la sierra convencional, como lo es la metralleta en comparación con un fusil de chispa; lo que antes se realizó con lentitud, ahora va a pasos agigantados (Horisch, 1982).

Debido a que las orquídeas son plantas adaptadas estrechamente a la vida arbórea, no pueden sobrevivir en el suelo una vez que el árbol ha sido derrumbado, ya que el sol directo las "quema". Además con la muerte del árbol se desprende la corteza en donde se hallan aferradas; la lluvia, el crecimiento de la maleza y otros factores completan su destrucción (Horisch, 1982). Desde un punto de vista conservador, las orquídeas constituyen un grupo estratégico: la gente las ama y así, al rescatar su hábitat, también rescatará las especies que tienen menos atractivo dentro de él.

Según Mora y Wagner, 1995 los bosques de Costa Rica están desapareciendo a un ritmo alarmante. Con la actual tasa de deforestación se calcula que en 10 años no habrá uno solo fuera de las áreas protegidas. En el dosel de los bosques (copa de los árboles), existe un mundo oculto que apenas estamos empezando a entender: el de las plantas que viven sobre otras plantas, las epífitas. Este mundo es muy frágil y puede extinguirse antes que muchos de nosotros y probablemente de nuestros hijos, hayamos tenido la oportu-

nidad de conocerlo. Se hallan dentro de este mismo artículo las especies de orquídeas presentes en Costa Rica que ameritan su reproducción in vitro, por su escasez o por el peligro de desaparecer como consecuencia de la destrucción del hábitat o de su comercialización indiscriminada. Las especies seleccionadas son: *Peristeria elata* y *Cattleya skinneri*, del apéndice I de CITES.

El futuro de las orquídeas en Costa Rica no es promisorio. Algunas de las especies tienen el riesgo de extinguirse en el transcurso de los años. Ya Standley (1937) mencionó que debido a la urbanización del Valle Central muchas epífitas y orquídeas nunca serían conocidas por la ciencia, a pesar de que en esa época, existía una cobertura boscosa de un 72% del territorio nacional. Dicha condición ha disminuido desde entonces hasta en un 26% y aún así se piensa que nuestro país tiene el más alto número de especies de orquídeas por km² (Snyder, 1991).

Según Snyder, (1993) cuando los costarricenses conviertan sus patios en jardines botánicos en miniatura unos pocos de los insectos polinizadores retornarán al medio y las flores de las orquídeas serán polinizadas y formarán cápsulas que se abrirán después de varios meses. Las diminutas semillas serán dispersadas en miles de direcciones y donde existan remanentes de bosques, con las condiciones apropiadas para su desarrollo, germinarán y crecerán.

Estudios conservadores colocan el número de especies de Costa Rica en 1200. El Jardín Lankester en investigaciones recientes (Mora, 1992) ha recopilado 1416, divididas en 179 géneros, aunque se estima que hay más de 1500 especies.

El gobierno ha dado incentivos económicos para cultivos de exportación no tradicionales que incluyen ornamentales y flores, pero poco se conoce del mercado para orquídeas propagadas artificialmente. El financiamiento en esta área no existe a pesar de que el clima y la disponibilidad de semillas son óptimos (Snyder, 1991).

La convención sobre la comercialización de especies de flora y fauna silvestres en peligro de extinción de 1973 (CITES), tiene tres apéndices; el I incluye la lista de todas las especies amenazadas que son o podrían ser afectadas por el comercio; éste provee las restricciones más fuertes en el acuerdo, ya que no pueden ser utilizadas con ese fin (Balistrieri, 1993).

En el apéndice II de CITES se incluyen las especies que aunque actualmente no están amenazadas con la extinción, pueden llegar a estarlo, a menos que su comercialización sea objeto de estrictas regulaciones para evitar la utilización incompatible con su supervivencia (Balistrieri, 1993. Set del 93. Estas son la: *Cattleya dowiana*, *Epidendrum pseudopendulum*, *Barkeria lindleyana*, *Houlettia tigrina*, *Huntleya burtii*, *Lacaena spectabilis*, *Oerstedella pinnifera*, *Pescatorea cerina*, *Pragmipedium caudatum*, *Pragmipedium longifolium*, *Psychopsis krameriana*, *Rossiglossum schlieperianum*, *Ticoglossum oerstedii*, *Trichopilia marginada*, *Trichopilia suavis*.

La situación actual de las especies de orquídeas en nuestro país fue uno de los factores que indujo a realizar la investigación presente, con el fin de rescatar y conservar el material genético de algunas especies de orquídeas autóctonas que se hallan en vías de extinción.

La técnica metodológica utilizada para la realización del proyecto es el cultivo *in vitro*.

Objetivos

- Determinar el método de micropropagación más adecuado para cada especie.
- Determinar el método de aclimatación para las especies cultivadas *in vitro*.
- Elaborar los pasaportes de introducción y el establecimiento de un protocolo de conservación (crioconservación) para cada una de las especies.

Metodología

La investigación se está llevando a cabo en el laboratorio del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

De las especies seleccionadas se han colectado muestras tanto vegetativas como por semilla, las que han sido introducidas *in vitro* en el laboratorio. Para cada una de las especies se ha establecido el protocolo de micropropagación más adecuado, las técnicas de cultivo de meristemas y la aclimatación de las plántulas producidas *in vitro*.

Dentro de la metodología está el establecimiento de un protocolo de conservación por dos métodos, el crecimiento lento y la crioconservación para poder llegar a formar un banco de germoplasma de las especies en vías de extinción.

Organismos que aportaron financiamiento

Para la realización del proyecto se cuenta con el apoyo financiero del Instituto Tecnológico de Costa Rica y de la Universidad Estatal a Distancia.

Resultados más relevantes

A. Selección e introducción de materiales:

De acuerdo con el artículo publicado por Mora, (1992) dentro de las especies seleccionadas en Costa Rica con la mayor presión de extinción, están: *Cattleya dowiana*, *Cattleya skinneri*, *Cattleya aurantiaca*, *Lycaste* sp (11 especies reportadas para Costa Rica), *Trichocentrum* sp (6 especies reportadas para Costa Rica), *Barkeria lindleyana* var *alba*, *Barkeria lindleyana*, *Laelia rubescens* var *alba*, *Trichopilia suavis*, *Oncidium*, *Encyclia*, *Epidendrum*, *Vainilla*, *Maxilaria*, *Pleurothallis*.

Algunas de estas especies se han introducido ya en el laboratorio del CIB y su estado puede resumirse en el cuadro 2.

B. Multiplicación masiva

Cuadro 2

Lista de especies trabajadas hasta al momento y estado de las mismas

Especie	Introducción del material	Protocolo de multiplicación	Aclimatación del material en invernadero	Cultivo de meristemos
<i>Cattleya dowiana</i>	x	x	x	
<i>Cattleya skinneri</i>	x	x	x	x
<i>Cattleya aurantiaca</i>	x			
<i>Lycaste bradeorum</i>	x	x	x	x
<i>Lycaste sp</i>	x	x	x	x
<i>Trichocentrum</i>	x	x	x	x
<i>Trichopilia suavis</i>	x	x	x	
<i>Oncidium escarvatum</i>	x	x	x	
<i>Oncidium istmanii</i>	x	x	x	
<i>Oncidium sp</i>	x			
<i>Encyclia cordillera</i>				

C. Aislamiento y cultivo de ápices y meristemos para conservación

Una vez establecido el método de micropropagación para cada una de las especies, requisito indispensable para desarrollar los métodos de conservación, se procede a realizar el cultivo de los meristemos.

Para estos experimentos se utilizaron las vitroplantas provenientes de la germinación aséptica de semillas de tres especies, *Cattleya skinneri*, *Lycaste bradeorum* y *Trichocentrum tigrinum*.

Una vez aislados los ápices y meristemos, éstos permanecieron ocho semanas en el medio de cultivo evaluado, para así determinar su efecto sobre su recuperación y regeneración. Pasado este período, las plántulas recuperadas se transfirieron al medio de cultivo normal para multiplicación y desarrollo, de manera que se integran al proceso de micropropagación ya establecido durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

Las tres especies de orquídeas presentaron diferentes respuestas con relación a las concentraciones de BA evaluadas (Cuadro 3). En *C. skinneri* se observó inducción de embriogénesis somática, con excepción del testigo sin reguladores de crecimiento. Ésta se manifestó por la formación de un callo en la superficie del ápice y la posterior formación de masas de protocormos, los cuales se desarrollaron en plántulas normales. El mayor número de explantes embriogénicos y el mejor desarrollo de los embriones se observó en el medio suplementado con 0,125 mg/l de BA. *L. bradeorum* y *T. tigrinum* sólo manifestaron una ligera respuesta organogénica con el tratamiento testigo (sin reguladores de crecimiento) y en el tratamiento con 0,05 mg/l BA + 0,05 mg/l de ANA. Sin embargo, todos los tratamientos favorecieron el desarrollo de los ápices de *L. bradeorum*; el tratamiento que consistió de 0,125 mg/l de BA adicionados al medio, fue el que permitió el mejor desarrollo de los ápices (80%) y la forma-

ción de raíces. *T. tigrinum* mostró una débil respuesta a los tratamientos evaluados. El desarrollo del explante inicial, en vás-

tajo propiamente dicho, sólo fue posible en el medio de cultivo simple, en ausencia de reguladores de crecimiento.

Cuadro 3
Respuesta del cultivo de ápices de tres especies de orquídeas en el medio MS con ANA (0,05 mg/l) y diferentes concentraciones de BAP.

Cattleya skinneri

Tratamiento (mg/l BA)	Nº explantes	Explantes + E.S.*	No. de E.S/explante	Desarrollo E.S
Testigo**	15	0	0,0	-
0,05	15	27	6,6	++
0,125	15	53	5,5	+++
0,250	15	29	4,0	+
0,500	15	13	0,2	+
0,750	15	20	0,6	+

* E.S.: Embriogénesis somática

** Sin reguladores de crecimiento

Lycaste bradeorum

Tratamiento	Nº explantes	Brotes %	N.Brotes/explante	Desarrollo ápice (%)
Testigo*	15	20	2,7	47(+)
0,05	15	6,6	0,7	47(++)
0,125	15	0	0	80 (++++)
0,250	15	0	0	13(+)
0,500	15	0	0	7(+)
0,750	15	0	0	26(+)

* Sin reguladores de crecimiento.

Trichocentum tigrinum

Tratamiento	Nº explantes	Brotes %	N.Brotes/explante	Desarrollo ápice (%)
Testigo*	15	13	0,3	40(+,+)
0,050	15	0	0	0
0,125	15	0	0	6,7(-,+)
0,250	15	0	0	6,7(-,+)
0,500	15	0	0	40(+)
0,750	15	0	0	33(+)

* Sin reguladores de crecimiento.

La determinación de un medio de cultivo que permita la regeneración de meristemos (0,5 mm) es necesaria si se quiere utilizar este explante como material para conservar a largo plazo (crioconservación). El medio de cultivo MS simple o suplementado con reguladores de crecimiento se evaluó como inductor de la regeneración de plantas a partir de meristemos aislados de vitroplantas de *C. skinneri*. Como se observa en el Cuadro 4, el medio MS simple permitió el mayor porcentaje de recuperación de meristemos (87,5%), sin embargo, esta recuperación fue a través del proceso de callogénesis (50%), con sólo un 37,5% de regeneración de plántulas. En un medio suplementado con 1 mg/l de BA se indujo un menor porcentaje de recuperación de meristemos, pero el total de éstos dio ori-

gen a plántulas y no a callos. La adición de ANA parece tener un efecto negativo en la recuperación de los meristemos. El mejor tratamiento (MS + 1 mg/l de BA) fue evaluado con *Lycaste bradeorum*, se obtuvo en este caso un 90% de regeneración de plántulas, lo que parece indicar que cada genotipo tiene sus propios requerimientos para la regeneración. Será importante realizar estas pruebas con un mayor número de materiales de orquídeas, de manera que se pueda encontrar un medio de cultivo donde la gran mayoría de estas especies responda satisfactoriamente.

Otras combinaciones de reguladores de crecimiento están siendo evaluadas, con el objetivo de determinar la respuesta de las diferentes especies de orquídeas. Estos tratamientos se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 4

*Recuperación y regeneración de plántulas de **Catleya skinneri** a partir de meristemos aislados de vitroplantas*

Tratamiento	% de recuperación	% de plántulas regeneradas
MS	87,5 (50**)	37,5
MS + 1,0 mg/l BA	54,5	54,5
MS + 0,5 mg/l BA + 1,0 mg/l ANA	37,5	37,5
MS + 0,3 mg/l BA + 1,0 mg/l ANA	37,5	37,5

Cuadro 5

Tratamientos bajo estudio para evaluar la regeneración de ápices y meristemos de diferentes materiales genéticos de orquídeas

BAP (mg/l)	Tratamientos		
	ANA (mg/l)		
	0,25	0,50	1,0
1,0	a	b	c
2,0	d	e	f
3,0	g	h	i

* Tratamientos **a e i** están en etapa experimental

D. Aclimatación de las vitroplantas en el invernadero

Una vez establecidos los métodos de multiplicación masiva para cada una de las especies se procedió a la aclimatación de las vitroplantas en el invernadero. Para ello se probaron diversos sustratos, hasta hallar los que favorecieran mayormente el crecimiento y adaptación de las plantas. Dentro de los sustratos probados había diferentes mezclas de raíz de helecho, fibra de coco, piedra pómez, gravilla, carbón, estereofón, cáscara triturada de coquito, etc.

Además del sustrato que se seleccionó, la estrategia para la aclimatación de las vitroplantas incluyó establecer el método para cada una, cosa que a la fecha se ha logrado con éxito para las especies estudiadas. Las mismas ya se hallan sembradas de manera individual y algunas ya tienen hasta 1 año y más de ser mantenidas en el invernadero. Podríamos afirmar sin temor a equivocarnos que esta parte del proyecto ya está concluida al menos para las especies existentes en el laboratorio.

Divulgación de resultados

Los resultados obtenidos hasta el momento han sido utilizados de varias maneras, en la docencia, en cursos como los de Biología General y Agrícola, para observar el crecimiento y desarrollo de los cultivos *in vitro*, y en el laboratorio de los mismos cursos para diversos aspectos de la enseñanza. En cursos cortos de Cultivo de Tejidos impartidos a nivel nacional e internacional; además en las charlas impartidas en cursos de diferentes áreas dentro de la institución y fuera de ella,

a estudiantes de secundaria que desean información sobre la misma y a otras personas interesadas en las orquídeas y su cultivo.

También ha sido usado en charlas varias de presentación a nivel local, internacional y como presentación del Centro de Investigación en Biotecnología.

Referencias bibliográficas

- Balistreri, C. 1993. CITES at 20- Part III *The convention on International trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna* (1973). American orchids Society Bulletin. Set.93. 930-932.
- Balistreri, C. 1993. CITES at 20- Part IV. *Importing and Exporting Plants under CITES*. American Orchids Society Bulletin. Oct.93. 1040-1044.
- García, J. 1995 *Orquídeas de Costa Rica y su cultivo*. Asociación Costarricense de Orquideología. Litografía e Imprenta Lil San José. Costa Rica. 64p.
- Horich, C. 1982. *La destrucción de los bosques tropicales: causa grave de la desaparición de su flora orquideófila*. Orquídeas. Asociación Costarricense de Orquideología 1:33-37.
- Mora-Retana, DE.; García, J. 1992. *Lista actualizada de las Orquídeas de Costa Rica* (Orquideaceae) Brenesia 37: 79-124.
- Snyder, G. 1991. *Will Orchids Survive? The current situation in Costa Rica*. American Orchid Society Bulletin. 60 (12): 1166-1175.
- Snyder, G. 1993 *Orchidscapes American*. Orchid Society Bulletin. Mayo 93: 474-481.