Cultivo in vitro del zapatito de dama o esclops. Una orquídea muy amenazada de nuestros valles pirenaicos

Carlos Ruiz López
José María Iriondo Alegría

Dpto. de Biología Vegetal. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad universitaria, s/n. E-28040 Madrid.
C/e: carlos.ruiz@upm.es; jose.iriondo@upm.es

Introducción

El zapatito de dama (*Cypripedium calceolus* L.) es una especie perteneciente a la familia Orchidaceae, subfamilia Cypripedioideae (para algunos autores, familia Cypripediaceae) que engloba un conjunto de 120 especies, distribuidas en cinco géneros básicamente tropicales epifitos como *Paphiopedilum* o *Phragmipedium*, caracterizada por la posesión de dos estambres fértiles y un estaminodio estéril. El polen no se agrupa formando un polinario, como es habitual en otras orquídeas, sino que permanece libre. Las flores no poseen espolón, pero el labelo toma una forma peculiar, en forma de cuenco, atractiva para los insectos, de donde le viene el nombre popular de «zapatito de dama» o «esclops» (figs. 1 y 2).

El zapatito de dama (Cypripedium calceolus) está considerada como la orquídea más bella de Europa.

Figura 1. La atractiva flor del zapatito de dama. Su gran labelo de color amarillo vivo en forma de cuenco o zapato se presenta sobre el fondo rojo de los sépalos.

El zapatito de dama (*Cypripedium calceolus*) está considerada como la orquídea más bella de Europa. Su gran labelo-trampa de color amarillo vivo, enmarcado por los sépalos rojos estilizados, la hace muy atractiva. La alteración y destrucción de sus hábitats naturales y un mal entendido coleccionis-

Figura 2. La flor del zapatito de dama.

mo constituyen sus principales amenazas y hacen que esta especie se encuentre clasificada «en peligro» en España según los criterios de amenaza de la UICN, Unión Mundial para la Naturaleza (BAÑARES *et al.*, 2003). Las poblaciones aragonesas se encuentran en el límite sur de distribución de la especie y por ello son especialmente vulnerables a los efectos del cambio climático.

Esta planta se distribuye por Eurasia y posee especies vicariantes en Norteamérica (*Cypripedium parviflorus, Cypripedium pubescens*) y en Asia (*Cypripedium shanxiense*) que pertenecen a la misma subsección *Cypripedium* (CRIBB y GREEN, 1997) con centro de diversidad en el sureste de Asia.

Las orquídeas tienen unas peculiaridades interesantes: a lo largo de toda su vida, o al menos en las etapas juveniles, necesitan de la ayuda de ciertos hongos micorrícicos que establecen una curiosa relación con las células parenquimáticas de la raíz de la planta. Los hongos emiten unas hifas que invaden las células formando unos pequeños ovillos. La planta disuelve los ovillos y aprovecha su contenido, especialmente compuestos nitrogenados. Por ello, a estas plantas se les denominans micoheterótrofas o micótrofas.

Uno de los aspectos más relevantes es la necesidad que tienen sus diminutas semillas, una vez dispersadas por el viento o por el agua, de entrar en contacto con un tapiz subterráneo, invisible a simple vista, formado por el cuerpo micelial de determinado grupo de hongos (*Rhizoctonia* s. l.). Estos hongos facilitan la absorción de agua y proporcionan los primeros nutrientes a la semilla, permitiendo su germinación. La presencia de estos hongos está fuertemente relacionada con la calidad del hábitat, que ha de tener unas características concretas de acidez, humedad, proporción de humus, etcétera.

La problemática de *Cypripedium calceolus* en el Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido

La población de *Cypripedium calceolus* del Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido resulta de gran interés debido a que se trata de la única población límite de distribución suroccidental de la especie que se encuentra en un territorio altamente protegido.

El hallazgo de unos pocos pies de *C. calceolus* en Ordesa en la campaña de búsqueda de 1999 realizada por GUZMÁN *et al.* (2000) supuso la confirmación de una población citada previamente. Las prospecciones intensivas realizadas en sus proximidades no dieron resultados positivos, por lo que la población parece estar constituida por dos pequeños núcleos. Desde 1999 (primer año en que se conoció) hasta la actualidad, en el primer núcleo se han encontrado tan sólo seis ejemplares no reproductores.

Figura 3. Núcleo de seis individuos no reproductivos de zapatito de dama en el Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido.

Las poblaciones aragonesas se encuentran en el límite sur de distribución de la especie y por ello son especialmente vulnerables a los efectos del cambio climático.

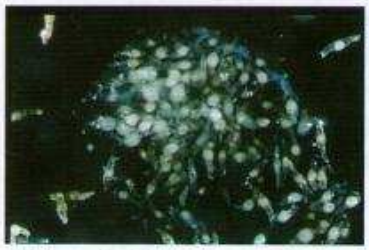

Figura 4. Primeros estadios de la germinación de las semillas en condiciones de cultivo in vitro.

Figura 5. Protocormo de zapatito de dama con raíces laterales y tallo aéreo en formación.

por objeto elaborar una estrategia de refuerzo de los núcleos existentes y reintroducción de nuevos núcleos dentro de los límites del parque. En el año 2005 se ha descubierto una nueva población de *Cypripedium calceolus* dentro del parque constituida por 183 individuos, siendo 63 de ellos reproductores. El reducido tamaño de esta nueva población y su peculiar microhábitat, así como su reducida fructificación, hace que se sigan manteniendo los objetivos previamente planteados.

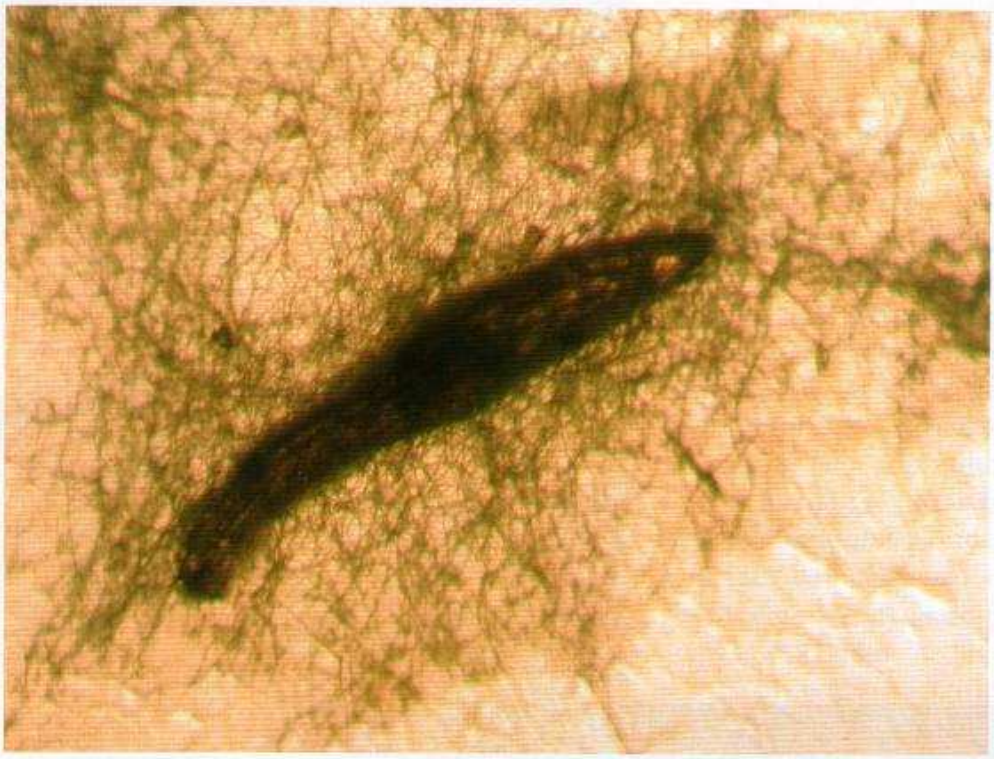

Figura 6. Semilla rodeada de una red de hifas.

Refuerzo de la población del valle de Ordesa

La necesidad de refuerzo de la población del valle de Ordesa se deriva del hecho de que en ninguno de los dos núcleos detectados se han encontrado plantas con flor en los últimos años. En consecuencia, resulta imposible el reclutamiento a corto plazo de nuevos individuos. Hay que tener en cuenta que esta planta suele tardar alrededor de tres años en emitir sus primeras hojas verdes tras su germinación, y más de diez años en florecer.

En el año 2001 se encontró un segundo núcleo con cuatro individuos vegetativos que había sido observado en 1995 (GUZMÁN *et al.* 2000). Estos individuos permanecieron latentes bajo tierra en el año 2002, cuando el equipo del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad Politécnica de Madrid acudió al lugar para tomar muestras para realizar un estudio genético. En años sucesivos este núcleo ha permanecido latente bajo tierra o bien han emergido dos individuos.

Por lo tanto, hasta el año 2005 se conocía únicamente una sóla población en el parque, constituida por dos núcleos de dos y seis plantas que no florecen (fig. 4). Ante esta situación tan extrema, el Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido ha promovido una serie de estudios sobre el zapatito de dama, realizados por el Departamento de Biología Vegetal de la Universidad Politécnica de Madrid, que tienen

Figura 7. Semillas en distintos estados de germinación en cultivo mixto en presencia de hongos micorrícicos.

La estrategia de refuerzo tiene por objeto introducir en los núcleos plantas procedentes de semillas recolectadas en la población que sea geográficamente más próxima al núcleo, tenga un hábitat natural más parecido o tenga una composición genética más afín con los individuos originales de Ordesa. El fin último es obtener una población viable adaptada al medio y con capacidad para afrontar los cambios que se sucedan en el futuro.

Para la selección de la población o poblaciones donantes se llevaron a cabo estudios genéticos de la población de Ordesa y de las otras dos poblaciones aragonesas situadas en el valle de Tena (Sallent) y valle de Pineta. Se utilizaron como marcadores regiones intermicrosatélites amplificadas mediante la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para evaluar la diversidad genética y la relación de proximidad genética entre las poblaciones. Los resultados mostraron una escasa diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas. En el núcleo de los seis individuos de Ordesa se comprobó que cuatro de los cinco individuos estudiados poseían el mismo genotipo, en otras palabras cuatro de los tallos o «ramets» observados proceden de una misma semilla (fig. 4).

El cultivo in vitro del zapatito de dama

Las técnicas encuadradas en el cultivo in vitro consisten, a grandes rasgos, en el cultivo de plantas en condiciones asépticas (libres de otros organismos que pueden ser patógenos), generalmente dentro de recipientes de vidrio, y en unas condiciones controladas; esto implica no sólo la temperatura, la intensidad de iluminación o el fotoperiodo, sino también la concentración y la naturaleza de los diferentes nutrientes (sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento,...) que se aportan al medio de cultivo.

Recolectando semillas de las poblaciones donantes

Tras las oportunas gestiones para obtener autorización para la recolección de las semillas, se realizó una visita a las poblaciones del valle de Tena y del valle de Pineta, y se recolectó un número reducido de frutos en un estado ligeramente inmaduro, pues está demostrado experimentalmente que no sólo *Cypripedium calceolus* sino la mayoría de las orquídeas terrestres tienen una fase de máxima germinabilidad, antes del final de la maduración. Esto es debido a que, en esta fase, los embriones están ya maduros, pero aún no han desarrollado las cubiertas hidrófobas que las hacen entrar en un estado durmiente. Este estado durmiente constituye una estrategia de dispersión en el tiempo así como de supervivencia a las condiciones adversas del clima, en espera de las más favorables. Tras almacenar debidamente etiquetados los frutos, estos se trasladaron a nuestra unidad de micropropaga-

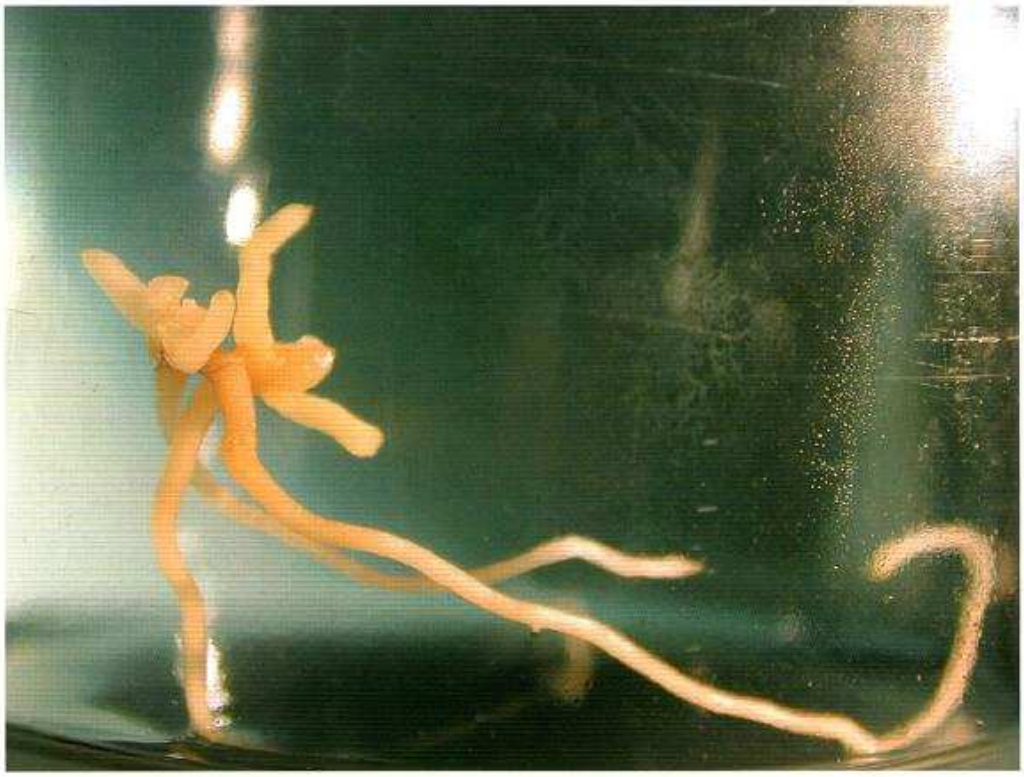

Figura 8. Protocormo de zapatito de dama con largas raíces laterales y tres tallos aéreos en desarrollo, preparado para la etapa de aclimatación.

ción. También se recolectaron posteriormente algunos frutos maduros, para disponer de semillas susceptibles de ser conservadas a largo plazo en el banco de germoplasma de nuestro departamento. Para lograr la germinación de estas semillas maduras se estudiaron distintos métodos de escarificación, es decir, métodos para erosionar las cubiertas impermeables de la semilla y permitir la absorción de agua.

La población de* Cypripedium calceolus *del Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido resulta de gran interés debido a que se trata de la única población límite de distribución suroccidental de la especie que se encuentra en un territorio altamente protegido.

Germinación in vitro

En ausencia del hongo que posibilita la germinación de las semillas de orquídeas en la naturaleza y dado que éstas carecen de sustancias de reserva, no es posible la germinación de estas semillas en macetas utilizando un sustrato convencional. Resulta necesario aportar a los embriones todos los nutrientes orgánicos e inorgánicos necesarios para la germinación. Por ello se recurre a la germinación in vitro (RASSMUSEN, 1998).

Para preparar los frutos, previamente al establecimiento de las semillas in vitro, hay que proceder a realizar una limpieza o asepsia que, básicamente, se realiza con hipoclorito sódico (lejía concentrada) y posteriores aclarados en agua estéril. A partir de entonces, trabajando dentro de una campana de flujo laminar que garantiza condiciones asépticas, diseccionamos los frutos y espolvoreamos las semillas en unas placas con un medio de cultivo apropiado que contiene los nutrientes sobre una matriz gelatinosa de agar que le da consistencia (RAMSAY *et al.*, 1998).

La cantidad de semillas que puede contener un fruto de esta orquídea es muy variable. Algunos autores han contabilizado hasta 15.000, si bien nosotros hemos llegado a contar hasta 10.500. No obstante la proporción de semillas que finalmente germinan es muy baja. Hemos observado que cuando las semillas se ponen a germinar masivamente (fig. 5) se obtienen resultados más satisfactorios que cuando lo hacen aisladamente, quizá debido a algún compuesto que liberan durante los primeros momentos de la germinación, con un efecto desencadenante hacia el resto de las semillas.

Creciendo en condiciones axénicas

Los cultivos axénicos son aquéllos en los que la planta crece completamente libre de la presencia de otros organismos. En estas condiciones resulta posible la germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas del zapatito de dama, sin necesidad de los hongos simbióticos que interaccionan con esta planta en la naturaleza. Vencemos los procesos de dormición que les impiden hidratarse y germinar, al tiempo que les aportamos los nutrientes necesarios, entre los cuales resulta clave la incorporación de compuestos nitrogenados orgánicos (aminoácidos) (MALMGREN, 1992).

En una primera fase del desarrollo, tras la germinación de la semilla, se genera una estructura denominada protocormo. En el protocormo se observa progresivamente un crecimiento bipolar que da lugar a la formación de las primeras raíces por un lado y a la formación de un rizoma sub-

Figura 9. Plántula de zapatito de dama emergiendo sobre el sustrato con sus primeras hojas fotosintéticas.

terráneo por el otro. Llegado un cierto punto del desarrollo, para el cual suele ser precisa una disminución drástica de la temperatura, aparece un primordio caulinar (tallo), flanqueado por unas pequeñas brácteas blancas que acaban tornándose de color pardo, que da lugar al tallo aéreo y a la formación del primer par de hojas verdes. El estado en el que se apunta el crecimiento vertical del tallo es el que reúne las mejores condiciones para trasplantar la planta a maceta con sustrato. A este proceso se le conoce con el nombre de «aclimatación» y constituye, asimismo, una fase muy delicada (fig. 6).

Cultivos mixtos

Una alternativa al cultivo en condiciones axénicas consiste en buscar el desarrollo de las plántulas en presencia de los hongos con los que se asocian. Éstos pertenecen a un grupo muy amplio que generalmente forman micorrizas de tipo orquidioide. Se caracterizan porque su cuerpo micelial recubre las raíces jóvenes de las plantas emitiendo hifas que penetran en su interior. Las hifas atraviesan las paredes celulares y forman en su interior unas estructuras en forma de pelotones u ovillos. Éstos acaban por ser digeridos por las células radicales de la orquídea, aportando su contenido a la planta. Así vemos que la relación que se establece entre estas dos especies está en entredicho, pues tiene más parecido con una situación de parasitismo que con una típica interacción simbiótica (figs. 7, 8).

En los trabajos realizados en nuestro laboratorio hemos aislado el hongo micorrizógeno y lo hemos cultivado en medio específico con el fin de inocular semillas y protocormos de *Cypripedium calceolus* en el momento preciso.

Vernalización a baja temperatura

Como comentábamos antes, cuando las plántulas del zapatito de dama tienen un desarrollo adecuado (más de tres raíces bien desarrolladas), se las somete a un tratamiento de bajas temperaturas durante 3-4 meses, en paralelismo con las condiciones de frío reinantes en invierno en condiciones naturales, para promover el desarrollo del tallo. En este momento, y coincidiendo con el final del invierno, es cuando se someten al proceso de aclimatación y se sacan al invernadero (fig. 9).

Aclimatándose al exterior

Las pequeñas plántulas se cultivan en unos recipientes de considerable superficie para que sus raíces se puedan extender horizontalmente, pues no penetran en profundidad. Necesitan, además, un sustrato no demasiado rico en nutrientes y con buena capacidad de retención de humedad que mantenga a su vez una buena aireación y drenaje. Sobre todo necesitan una elevada humedad ambiental y unas temperaturas no muy altas en verano, que inhibirían su desarrollo (fig. 10).

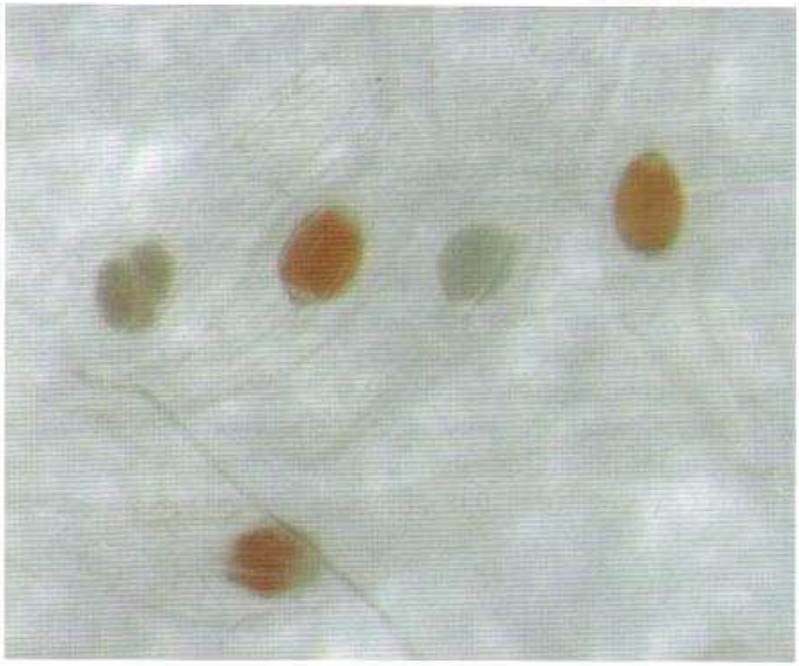

Figura 10. Semillas a las que se les ha efectuado el test del tetrazolio. La coloración rojiza en el embrión indica que las semillas son viables.

Estrategia de conservación de germoplasma

Además de la importancia de establecer un protocolo de producción de planta de Cypripedium calceolus resulta vital conocer los parámetros que permiten la conservación de sus semillas a largo plazo. Para ello se utilizan semillas maduras sobre las que se actúa como se hace en general con el resto de semillas de especies ortodoxas, esto es, reduciendo su contenido de humedad mediante agentes desecantes y almacenándolas a bajas temperaturas. Como el agente desecante más utilizado, el gel de sílice,

actúa de forma demasiado enérgica en las semillas de esta especie, afectando a su capacidad germinativa, utilizamos cloruro cálcico de efectos deshidratantes más suaves. La comprobación de la viabilidad de las semillas almacenadas la hemos realizado mediante el denominado test del tetrazolio, mediante el cual, los embriones vivos, en el interior de las semillas, se tiñen de color rojo (fig. 11).

Conclusión

Los estudios financiados por el Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido han permitido poner a punto un sistema para la producción de plantas y conservación ex situ de semillas de zapatito de dama, aspecto esencial para la implementación de actuaciones de refuerzo y reintroducción de esta planta en el parque. Hasta el momento la etapa que más condiciona la producción de planta es la fase de aclimatación, proceso que resulta poco exitoso bajo las condiciones ambientales de Madrid. Una situación parecida tuvo lugar en una actuación similar llevada a cabo en el Reino Unido (RAMSAY y STEWART, 1998). En la actualidad se está trasladando la operación de aclimatación a instalaciones situadas en los Pirineos, donde las condiciones ambientales son más semejantes a las del hábitat natural.

Bibliografía

CRIBB, P. and GREEN, P. 1997. The Genus *Cypripedium. A Botanical Magazine Monograph*. The Royal Botanic Gardens, Kew, in association with Timber Press, Portland. 301 pp.

GUZMÁN, D., GOÑI, D. y GARCÍA, M. B. 2000. *Estudio y Conservación de Seis Especies de Flora Amenazada en Aragón*. Cypripedium calceolus *L. LIFE Flora amenazada 1997-2000*. Diputación General de Aragón, Zaragoza. 77 pp. [Informe inédito.]

MALMGREN, S. 1992. Large scale asymbiotic propagation of *Cypripedium calceolus*. *Micropropagation News*, **1**, pp. 59-64.

RAMSAY, M. and STEWART, J. 1998. Re-establishment of the lady's slipper orchid (*Cypripedium calceolus* L.) in Britain. *Botanical Journal of Linnean Society*, **126**, pp. 173-181.

RASMUSSEN, H. N. 1998. *Terrestrial Orchids. From Seed to Mycotrophic Plant*. Cambridge University Press, Cambridge. 444 pp.

BAÑARES, Á., BLANCA, G., GÜEMES, J., MORENO, J. C. y ORTIZ, S. (eds.) 2003. *Atlas de la Flora Vascular Amenazada de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid. 1067 pp.

Autores de todas las fotografías:
Carlos RUIZ LÓPEZ y José María IRIONDO ALEGRÍA.