

# Propagación sexual y cultivo de una especie amenazada; *Tabernaemontana apoda* C. Wright ex Sauvalle (*Apocynaceae*): evaluación de la semilla como posible factor de riesgo.

Pedro Iván López García

Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana

## RESUMEN

*Tabernaemontana apoda*, especie arbórea endémica de la provincia de Sancti Spíritus, con categoría I (indeterminada) está siendo evaluada con vistas a conocer los factores de riesgo que pueden estar afectando su limitado areal de distribución. Se reportan los resultados del trabajo desarrollado con vistas a conocer aspectos de su fenología y potencialidad reproductiva. Se ofrecen: la época de floración, de fructificación y de cosecha de frutos y semillas de los diez ejemplares adultos existentes en la colección del Jardín Botánico Nacional, así como los resultados de las pruebas de germinación realizadas a sus semillas. Se discuten los resultados.

**Palabras clave:** cultivo de semillas, conservación, factores de riesgo, propagación, *Tabernaemontana apoda*.

## ABSTRACT

*Tabernaemontana apoda*, endemic arboreal species of the province of Sancti Spíritus, with category I (indeterminate), is being evaluated in order to know the risk of extinction factors that may be affecting their limited areal of distribution. Results of the work developed to know aspects of their fenology and reproductive potential are reported. These are: flowering time, fructification and fruits and seeds crop of the ten existing adults plants in the National Botanic Garden's collection, as well as the results of the germination tests accomplished to their seeds. Results are discussed.

**Key words:** seeds cultivation, conservation, risk factors, sexual spread, *Tabernaemontana apoda*.

## INTRODUCCION

Tarea de primer orden en los estudios para la conservación de especies raras y amenazadas es la de buscar las causas por las cuales una especie o sus poblaciones presentan problemas de supervivencia, lo cual puede deberse a diferentes factores tanto intrínsecos como extrínsecos.

La especie objeto de estudio, *Tabernaemontana apoda* C. Wright ex Sauvalle, pertenece a la familia *Apocynaceae*. Sus representantes se caracterizan por producir diversos glucósidos y alcaloides tóxicos muy usados en farmacología, como los célebres alcaloides de las especies del género *Rauwolfia* (Pio Fontquer, 1992). El género *Tabernaemontana*, está representado en Cuba por otras dos especies: *T. amblyocarpa* Urb. y *T. citrifolia* L. a las cuales se les atribuyen propiedades medicinales (Fuentes Fiallo, 1988).

Lippold (1980), reporta a la especie como un endemismo de Cuba central con muy escasas poblaciones ubicadas en tierras bajas al sur y al este de la Sierra del Escambray. Se ha localizado desde Casilda hasta Trinidad por el sur, extendiéndose a las sabanas de Sancti Spíritus en el norte. El autor reporta además, que el areal se divide, ya que se ha encontrado en las llanuras alrededor de las lomas de Soledad cerca de Cienfuegos. Recientemente ha sido observada en las lomas de Banao en pequeñas

poblaciones aisladas (Bequert, com.pers.).

Las localidades se encuentran situadas geográficamente, en dos distritos pertenecientes al subsector Cuba Centro Oriental del sector Cuba central; el distrito Escambray (Guamuaya), dividido en los subdistritos Lomas de Trinidad y Lomas de Sancti Spíritus en el que se encuentran la lomas de Banao; y el distrito Costero de Trinidad que se caracteriza por la presencia de numerosos endemismos, siendo Casilda un centro de endemismo local (Samek, 1973).

El género fue descrito por Linneo y la descripción de la especie realizada por C. Wright aparece publicada en el Tomo VII de los Anales de la Academia de Ciencias Médicas, Físicas y Naturales de La Habana en Julio de 1870, tomado de Revisio Catalogi Grisebachiani vel Index Plantarum Cubensius; de Francisco A. Sauvalle. Esta presenta una sinonimia *Peschiera apoda* (C. Wright ex Sauvalle) Markgraf, publicada en Notizbl. Bot. Gart. Berlin 14: 171, 1938 (Index Kewensis, 1947).

Alain (1957) la caracteriza como arbusto o arbolito lampiño de 2-9m de altura; hojas anchamente ovales a obovado-elípticas de 8-17cm, nervios prominentes en el envés; corimbos muy ramosos, flores numerosas, pequeñas, blanco cremosas (Fig. 1); folículos gruesos, subreniformes de 5-8 cm (Fig. 2).



**Fig.1** Inflorescencia corimbo-racemosa de *Tabernaemontana apoda*: nótese las numerosas flores pequeñas.



**Fig.2** Fruto en bifolículo de *Tabernaemontana apoda*: nótese los folículos gruesos, dehiscentes.

Esta especie integra la lista de plantas medicinales empleadas en Cuba, citadas por Fuentes Fiallo (1988) en su trabajo «Las plantas medicinales en Cuba», pero de la cual existe muy poca referencia en toda la bibliografía consultada con relación al tema, no integrando la lista de especies potencialmente medicinales que da dicho autor. Sin embargo en estudios realizados con anterioridad al presente trabajo se reportan dos alcaloides nuevos detectados en las hojas de *T. apoda*: la isoapodina y la isoapodinina (Iglesias, 1980).

Por esta razón, el estudio de este taxón desde el punto de vista conservacionista tiene gran importancia para el mantenimiento de la biodiversidad, pues debido a las presiones que ha ejercido el hombre sobre el medio en que habita, éste integra la lista de especies cubanas amenazadas, siendo reportado como Raro en 1983 (Borhidi y Muñiz) y con categoría Indeterminada en 1989 (IUCN). Por ello, conocer su problemática a fondo y tratar de determinar los factores de riesgo a que está sometido es una tarea de primer orden, sobre todo para especies, que como ella, son poco conocidas, pero que, por sus potencialidades farmacológicas, pueden convertirse en un fitorrecurso de gran utilidad.

Considerando todos estos antecedentes, el objetivo de este trabajo estuvo encaminado a conocer las posibilidades de la reproducción sexual de la especie. Las características de sus semillas, y el tiempo y por ciento en que ocurre su germinación; teniendo en cuenta diferentes condiciones y períodos de almacenamiento; fueron los aspectos analizados para poder determinar su posible incidencia en la ineficiente reproducción natural de la especie dentro de las colecciones del Jardín Botánico Nacional y para poder evaluarla como posible factor de riesgo para la conservación de la especie en la naturaleza.

#### MATERIALES Y METODOS

Se procedió a hacer un estudio de los ejemplares existentes en el Jardín Botánico Nacional, determinando su número y las épocas de floración, de fructificación y de cosecha de frutos y semillas.

Para el estudio de la germinación se montaron tres experiencias con diferentes parámetros a evaluar, entre los que se consideraron, la composición del suelo, el tamaño de los frutos, la época de recolección de las semillas y la presencia o no del arilo carnoso en éstas.

La primera experiencia se realizó con semillas recolectadas al comienzo de la época de cosecha y se tuvo en cuenta la presencia o no del arilo carnoso que rodea a éstas, así como el tamaño de los frutos.

La segunda se llevó a cabo con semillas almacenadas durante cinco meses en las condiciones del banco de semillas del Jardín Botánico Nacional y con semillas recolectadas en los árboles, luego de cinco meses de la primera cosecha; en ambos casos las semillas fueron desprovistas del arilo carnoso.

En la tercera, también se tomó en consideración la presencia o no del arilo carnoso y se utilizaron semillas recién cosechadas, pero al año siguiente de la primera experiencia. En este caso se realizó un tratamiento pregerminativo, consistente en la inmersión en agua por 72 horas de 224 semillas de las 448 que fueron sembradas.

Las semillas se pusieron a germinar en cajas metálicas de propagación a una profundidad de un centímetro.

El sustrato utilizado en cada caso fue tamizado con malla de 5 mm y esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 1,2 atm. y 110°C.

La germinación se llevó a cabo bajo condiciones de temperatura y luz natural filtrada. Esto se logró colocando las cajuelas de germinación en un umbráculo cubierto por un sarán negro. El riego se sistematizó una vez al día.

La evaluación de la germinación fue sistemática para poder determinar su comienzo en cada tratamiento. Se tomó como dato de trabajo para el procesamiento estadístico el número de semillas germinadas por día. El criterio que se siguió para considerar que las semillas habían germinado fue la aparición del hipocotilo.

Paralelamente se montaron pruebas control en condiciones de laboratorio, consistentes en la utilización de envolturas de papel de filtro sumergido en agua por su parte inferior y conteniendo en el extremo superior 25 semillas (Fig.3).

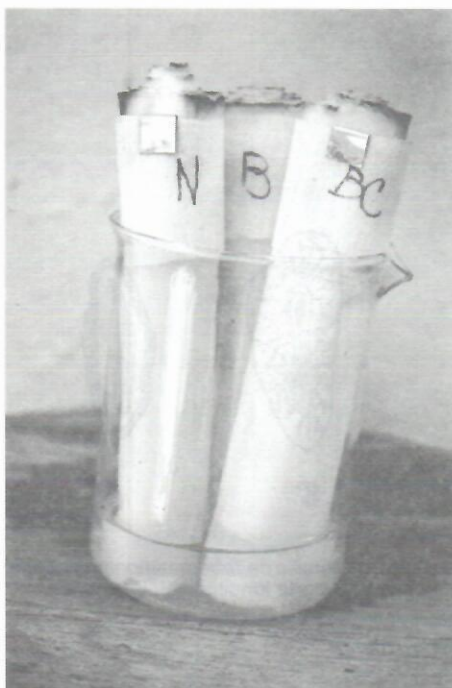


Fig.3 Envolturas de papel de filtro sumergido en agua por su parte inferior y conteniendo en el extremo superior 25 semillas.

Estas pruebas fueron realizadas mensualmente a semillas almacenadas bajo diferentes condiciones de temperatura (10, 18-20 y más de 24°C). Para las que se almacenaron entre 18-20°C se tomó en cuenta su coloración, la cual está dada, al parecer, por el grado de maduración

del fruto. Las semillas claras (B) fueron obtenidas de frutos maduros que no han comenzado a abrirse, las que presentan dos tonalidades (BC) corresponden a frutos maduros que comienzan a abrir y las oscuras (N) a frutos ya abiertos (Fig.4). En este caso el criterio de germinación que se siguió fue la aparición de la radícula, aunque también se tomó como dato la prolongación del hipocotilo a un centímetro de altura, lo cual nos permitió comparar los resultados obtenidos.

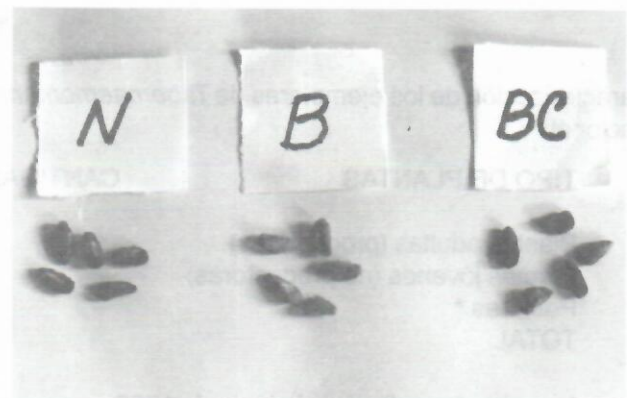


Fig.4 Semillas almacenadas a temperaturas de entre 18-20°C, clasificadas según su coloración dada por la madurez de los frutos. B: obtenidas de frutos maduros que no han comenzado a abrirse, BC: obtenidas de frutos maduros que comienzan a abrir, N: obtenidas de frutos ya abiertos.

Para determinar la viabilidad de las semillas se utilizó; luego de conocer la posición y el tamaño del embrión, utilizando técnicas de microscopía óptica; un compuesto químico, 2,3,5 triphenyl cloruro de tetrazolium - C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>Cl- (TTC), el cual reacciona con las deshidrogenasas ligadas a la respiración, formando un complejo coloreado.

Este compuesto fue aplicado a semillas acabadas de recolectar, a semillas recolectadas seis meses después de la cosecha y a semillas almacenadas por un año.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Características de los ejemplares

Los 23 ejemplares de *T. apoda* existentes en el Jardín Botánico Nacional se clasificaron en plantas productoras, no productoras y posturas como muestra la Tabla I.

La floración en los ejemplares adultos ocurre entre los meses de abril a junio y la colecta de frutos y semillas se realiza de noviembre a enero, aunque pueden colectarse frutos secos, en los cuales persisten las semillas aún abiertos éstos, hasta después de la floración de la siguiente temporada, incluso durante la aparición y desarrollo de los frutos de ésta.

**Características morfológicas de frutos y semillas**

El fruto en bifolículo con lóbulos obtusos y gruesos de seis centímetros de largo y tres centímetros de ancho aproximadamente, es dehiscente, de color pardo-rojizo cuando está maduro y pardo oscuro cuando se seca. Al abrirse, deja expuestas numerosas semillas revestidas de un arilo carnoso de color naranja intenso dispuestas en dos hileras, una por cada lóculo (Fig.5).

La semilla presenta una cubierta dura, de color pardo oscuro y con ornamentaciones en forma de surcos. Es ancha hacia la parte superior y aguzada hacia el extremo inferior. Presenta un embrión alargado en forma de huso que ocupa casi todo su eje central (Fig.6). En la Tabla II se presentan las dimensiones promedio del largo y ancho, y del peso, además de algunos datos estadísticos determinados a partir de una muestra al azar de 100 semillas.

**Tabla I**

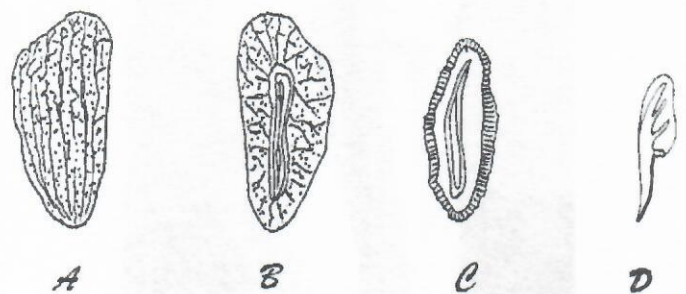
Caracterización de los ejemplares de *Tabernaemontana apoda* C.Wright ex Sauvalle, existente en el Jardín Botánico Nacional.

TIPO DE PLANTAS	CANTIDAD DE PLANTAS	ALTURA APROXIMADA (m)
Plantas adultas (productoras)	10	4 a 5
Plantas jóvenes (no productoras)	7	2 a 3
Posturas *	6	0,5 a 0,6
TOTAL	23	

\* sembradas a finales de junio de 1995.



**Fig.5** Bifolículo de un fruto de *Tabernaemontana apoda*: nótese que al abrirse deja expuestas numerosas semillas rodeadas de un arilo carnoso de color naranja intenso dispuestas en dos hileras, una por cada lóculo.



**Fig. 6** Esquema de una semilla de *Tabernaemontana apoda*: A-vista dorsal, B-vista ventral, C-corte longitudinal, D-embrión.

Tabla II

Estadísticos obtenidos a partir del análisis de una muestra al azar de 100 semillas.

PARAMETROS	LARGO (cm)	ANCHO (cm)	PESO (g)
X	0,932	0,474	0,0598
sn-1	0,1014	0,0579	0,0096
Sx	93,2	47,4	5,98
Sx <sup>2</sup>	87,88	28,2	0,3668

**Germinación**

Los resultados que corresponden a la germinación durante la primera experiencia representó un 54,32% (Tabla IV). Las tres variables o efectos principales (tamaño del fruto, presencia o no del arilo carnoso en la semilla y el tipo de sustrato, sin que mediara ningún tratamiento pregerminativo), revelaron que no existe diferencia significativa entre los tratamientos en cuanto al tiempo de germinación de las semillas, las cuales comienzan a germinar entre la tercera y quinta semanas después de sembradas.

Teniendo en cuenta el número de semillas germinadas por tratamiento, los mejores resultados correspondieron a las semillas sembradas sin arilo, que germinan en un 70,83%. De las 336 semillas sembradas con arilo sólo germinó el 37,80%. (Tabla III).

En la tercera experiencia los resultados fueron muy similares a la anterior, pues de un total de 448 semillas sembradas germinaron 276 lo que representa el 61,61% del total (Tabla IV).

A través del análisis de varianza se comprobó que, a pesar de la aplicación de un tratamiento pregerminativo a la semilla, no se produjo ninguna diferencia significativa en cuanto al comienzo de la germinación, que ocurrió entre la cuarta y quinta semanas después de sembradas. Al igual que en el primer experimento los mejores resultados corresponden a las semillas sembradas sin arilo con un 76,79% de germinación (Tabla III). En cuanto al análisis realizado, teniendo en cuenta el tratamiento pregerminativo aplicado, se determinó que no es recomendable, debido a que el número de semillas germinadas es mayor cuando no son previamente tratadas, incluyendo aquellas a las que se les eliminó el arilo. La causa puede ser la presencia de alguna sustancia inhibidora de la germinación, ya sea en el arilo o en la testa de la semilla, que al diluirse en el agua se facilita su absorción por la semilla.

Para ambas experiencias los máximos de germinación ocurrieron entre la segunda y tercera semanas después de comenzada.

Tabla III

Porcentaje de semillas germinadas teniendo en cuenta el efecto arilo.

EXPERIENCIA	SEMILLAS CON ARILO			SEMILLAS SIN ARILO		
	SEMBRADAS	GERMINADAS	%	SEMBRADAS	GERMINADAS	%
1	336	127	37,80	336	238	70,83
3	224	104	46,43	224	172	76,79

Tabla IV

Porcentaje de germinación de *Tabernaemontana apoda*, en cada experiencia realizada.

EXPERIENCIA	SEMILLAS SEMBRADAS	SEMILLAS GERMINADAS	PORCIENTO
1	672	365	54,32
2	672	15	2,23
3	448	276	61,61

El 2,23 % de germinación alcanzado en la segunda experiencia con semillas colectadas cinco meses después de la primera cosecha, fue lo que determinó la realización del análisis de viabilidad a las semillas. A través de los resultados obtenidos se demostró que las semillas, después de seis meses de almacenadas, pierden su viabilidad, lo cual comienza a suceder a partir del tercer mes de almacenamiento.

Estos resultados coinciden con los obtenidos durante la germinación en condiciones de laboratorio, a través de la cual se alcanzó un 100% durante los tres primeros meses posteriores a la cosecha (Fig.7), disminuyendo a partir del cuarto mes a un 40% y a un 7% a los seis meses de la cosecha.

De estas pruebas también se dedujo que las semillas para germinar están condicionadas a un alto porcentaje de humedad, lo cual no ocurre siempre en el hábitat natural de la especie.

Otro resultado a destacar es que bajo estas condiciones la germinación ocurre entre los 9 y 14 días y dos o tres

días después el hipocotilo alcanza un centímetro de altura. Este suceso tuvo lugar entre la cuarta y quinta semanas en condiciones de vivero. Igualmente el máximo en la germinación sucede entre los 10 y 12 días y no dos o tres semanas después de comenzada la germinación como ocurre en vivero.

Para la realización de estas pruebas se controlaron las condiciones de almacenamiento a que se sometieron las semillas, con lo cual se demostró que la temperatura óptima de almacenamiento debe estar entre los 10 y 20°C, pues las semillas almacenadas a temperaturas más altas presentaron un 10% de germinación a partir del tercer mes (Tabla V), no siendo así en las que se almacenaron a 10 o entre 18 y 20°C, cuyo porcentaje de germinación comienza a disminuir a partir del cuarto mes después de la cosecha.

Todas las posturas obtenidas después de la germinación y mantenidas en condiciones de vivero son capaces de sobrevivir si se les proporcionan los cuidados mínimos indispensables que convencionalmente se realizan en estas instalaciones (Fig.8).

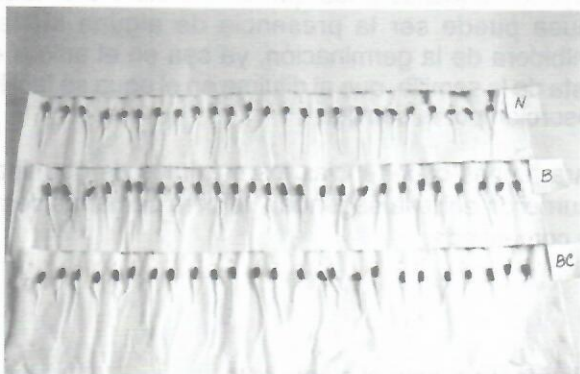


Fig.7 Semillas de *Tabernaemontana apoda* puestas a germinar dos meses después de la cosecha: nótese además del 100% de germinación alcanzado, el desarrollo de la planta a los 15 días después de la "siembra".

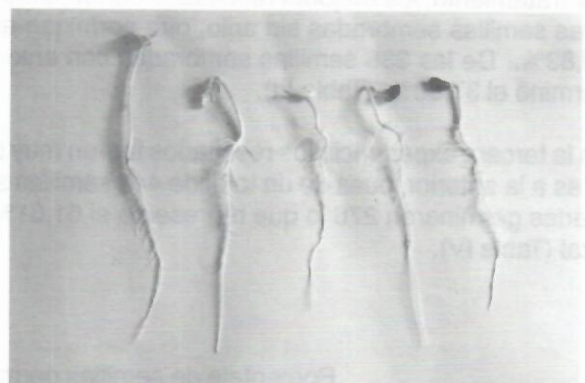


Fig.8 Posturas en diferentes fases de desarrollo aptas para ser transplantadas a bolsas plásticas.

Tabla V

Tiempo de germinación de las semillas de *Tabernaemontana apoda* en condiciones de laboratorio.

TEMP.ALMACEN. °C	TIEMPO DE GERMINACIÓN (DÍAS)						TOTAL GERMINADAS	%
	9	10	11	12	13	14		
10	0	12	9	14	7	8	50	50100
18-20	10	17	15	12	4	2	75	75100
25	0	0	2	3	0	0	50	5 10

Este trabajo demuestra la necesidad de hacer un estudio profundo en el hábitat natural de la especie, con el propósito de determinar si su reducido areal de distribución depende de factores extrínsecos que, unido al corto período de viabilidad de las semillas, dificulten el proceso natural de reproducción de la especie, como ocurre en las condiciones de cultivo *ex situ* dentro de las áreas del Jardín Botánico Nacional.

Uno de estos factores extrínsecos, observados en las condiciones de cultivo expuestas anteriormente, está relacionado con la dispersión de las semillas. Se comprobó, luego de observaciones periódicas realizadas en la época de fructificación y apertura de los frutos, que las plantas no fueron visitadas por ningún agente externo que se encargue de realizar la tarea de dispersión, que es considerada como esencial para la especie en cuestión, ya que sus semillas tienen la particularidad de permanecer en el fruto luego de su apertura.

Los frutos, pasado un período de tiempo que oscila entre 15 y 20 días, se secan y como consecuencia sus bordes vuelven a unirse quedando en su interior la mayoría de las semillas que comienzan a cubrirse de hongos, que al parecer utilizan el arilo carnoso como sustrato. Además, no se desprenden de la planta con facilidad, incluso se han observado frutos secos durante la floración de la siguiente temporada, como se señaló con anterioridad, en los que permanecen las semillas en su interior.

Otro factor de riesgo que se desprende de este estudio y que debe tenerse en cuenta al evaluar el hábitat natural de la especie es la humedad relativa en la zona, ya que la germinación de las semillas está condicionada al 100% de humedad estable independientemente del sustrato que se utilice. Este factor constituye, al parecer, la otra causa por la cual los ejemplares del Jardín Botánico Nacional no se propagan naturalmente dentro de su radio de acción, que se caracteriza por la presencia de un suelo pedregoso casi desprovisto de su capa vegetal y con poca retención de agua.

#### AGRADECIMIENTOS

El autor desea agradecer a Pedro Alvarez por el trabajo fotográfico.

#### BIBLIOGRAFÍA

Borhidi A y Muñiz O. 1983. Catálogo de plantas cubanas

amenazadas o extinguidas. Editorial Academia: La Habana, 85p.

Fuentes Fiallo V. 1988. Las Plantas Medicinales en Cuba. Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas. Estación Experimental de Plantas Medicinales Dr. Juan T. Roig. La Habana, 412p.

Hill AW et Salisbury EJ. 1947. Index Kewensis: plantarum phanerogamarum. Supplementum X. Herbarii horti regii Botanici Kewensis Curatores: Oxonii, p167.

Iglesias R. 1980. Estado actual de las investigaciones realizadas sobre *Tabernaemontana apoda* C.Wright ex Sauvalle. Resúmenes I Symposium Latinoamericano y del Caribe sobre Fármacos Naturales: Ciudad de La Habana, 22-26 de julio.

IUCN. 1989. Rare and Threatened Plants of Cuba: *ex situ* conservation in Botanic Gardens. IUCN Botanic Gardens Conservation Secretariat: Kew, Richmond, Surrey, 36p.

León Hno. y Alain Hno. 1957. Flora de Cuba Vol. IV. Imp. P. Fernández y Cia., S.en C.: La Habana, 556p.

Lippold H. 1980. Zur Verbreitung einiger Vertreter der Apocynaceae auf Cuba. Wiss. Ztschr. Friedrich-Schiller- Univ. Jena, Math.-Naturwiss.R. 29(4): 509-518.

Pio Font Quer. 1992. Plantas Medicinales: el Dioscórides renovado. Editorial Labor, S.A. 13ª edición: Barcelona, 1033p.

Samek V. 1973. Regiones Fitogeográficas de Cuba. Academia de Ciencias de Cuba: Serie Forestal 15: La Habana, 63p.

\_\_\_\_\_ 1870. Flora Cubana: Revisio Catalogi Grisebachiani vel Index Plantarum Cubensius; de Francisco A. Sauvalle. Anales de la Academia de Ciencias Médicas, Físicas y Naturales de La Habana en Julio, VII: 103-104.

**Recibido:** 26 de noviembre de 1997.

**Dirección del autor:** Jardín Botánico Nacional, Carretera del Rocío km 3 1/2, Calabazar, Boyeros, Ciudad de La Habana, Cuba. CP 19230