

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
FACULTAD DE AGRONOMIA



DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS AGRARIAS

**“PROLONGACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LA SEMILLA DE
CACAO (*Theobroma cacao* L.), BAJO CUATRO SISTEMAS DE
CONSERVACIÓN EN TINGO MARÍA”**

Tesis

Para optar el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

DAWIS JUNIOR DAVILA ALVARADO

TINGO MARÍA - PERÚ

2008



F03

D19

Dávila Alvarado, Dawis J.

Prolongación de la Viabilidad de la Semilla de Cacao (*Theobroma cacao* L.)
Bajo Cuatro Sistemas de Conservación en Tingo María. Tingo María 2008

76 h.; 8 cuadros; 15 fgrs.; 22 ref.; 30 cm.

Tesis (Ing. Agrónomo) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo
María (Perú). Facultad de Agronomía.

THEOBROMA CACAO L. / VIABILIDAD-SEMILLA / ALMACENAMIENTO /
SISTEMA – CONSERVACIÓN / CONTENIDO - HUMEDAD / DESECACION /
TINGO MARIA / RUPA RUPA / LEONCIO PRADO / HUANUCO / PERU.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE AGRONOMIA



ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

No.003-2009-D-FA/UNAS.

“AÑO DE LAS CUMBRES MUNDIALES EN EL PERU”

BACHILLER : DAWIS JUNIOR DAVILA ALVARADO

TITULO DE LA TESIS : "PROLOGACION DE LA VIABILIDAD DE LA SEMILLA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) VARIEDAD CCN-51, BAJO CUATRO SISTEMAS DE CONSERVACION "

JURADO CALIFICADOR :

 Presidente : ing.M.Sc. DAVID GUARDA SOTELO

 Vocal : Ing. JORGE LUIS ADRIAZOLA DEL AGUILA

 Vocal : Ing. CARLOS M. MIRANDA ARMAS

 Asesor : Ing. LUIS F. GARCIA CARRION

FECHA DE SUSTENTACION : LUNES 13 DE MAYO 2009

HORA DE SUSTENTACIÓN : 3:00 p.m.


LUGAR DE SUSTENTACIÓN : SALA DE AUDIOVISUALES-FAUNAS.

CALIFICATIVO : MUY BUENO

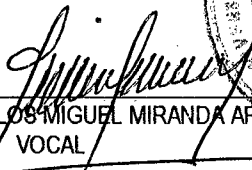
RESULTADO : APROBADO


OBSERVACIONES AL ACTA : EN HOJA ADJUNTA

Tingo Maria, 14 de Mayo de 2009


Ing. MSc. DAVID GUARDA SOTELO
PRESIDENTE


Ing. JORGE LUIS ADRIAZOLA DEL AGUILA
VOCAL


Ing. CARLOS MIGUEL MIRANDA ARMAS
VOCAL


Ing. LUIS FERNANDO GARCIA CARRION
ASESOR

DEDICATORIA

Con eterna gratitud a mi madre y hermana: Carmen y Cristina, por su amor, paciencia y comprensión durante mi formación profesional.

A mi padre que siempre está presente en mi mente.

A mis tíos en general por el apoyo brindado en mi etapa de estudiante.

AGRADECIMIENTO

- A Dios por darme la vida y por permitirme alcanzar mi mayor anhelo; de ser profesional.
- A la Universidad Nacional Agraria de la Selva por darme la oportunidad de formarme profesionalmente en sus aulas.
- Al Ing. Luis García Carrión, asesor, por las enseñanzas, orientación y sabios consejos que me brindó.
- A los miembros integrantes del Jurado de Tesis: Ing. Msc. David Guarda S., Ing. Carlos Miranda A. e Ing. Jorge Adriazola de Águila.
- A mis amigos Esteban Paredes Vega, Joel Ayre Pérez, Carmen De La Cruz Alvarez Zully Durán Ruiz, Beatriz Herrera Policarpio, Margarita Fonseca, Hilmer Luna Tevez y otros que estuvieron presentes en todo momento, apoyándome.
- A todas las personas que en forma directa o indirecta hicieron posible el término del presente trabajo de tesis.

INDICE

	Página.
I. INTRODUCCIÓN.....	10
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	12
2.1 La semilla y su comportamiento durante la conservación.....	12
2.2 La germinación de semillas.....	14
2.3 Conservación de semillas.....	17
2.3.1 Viabilidad de las semillas.....	18
2.3.2 Pruebas de viabilidad.....	20
2.3.3 Métodos para determinar la viabilidad del embrión.....	20
2.3.3.1 Prueba topográfica de tetrazolio.....	20
2.3.3.2 Prueba de rayos x.....	21
2.3.4 Factores que afectan la conservación de las semillas.....	22
2.3.4.1 Humedad de la semilla.....	22
2.3.4.2 Temperatura.....	23
2.3.4.3 Tolerancia de la desecación de las semillas.....	25
2.3.4.4 Gases.....	26
2.3.4.5 Estado de la semilla.....	27

2.4	Sistemas de conservación de semillas.....	30
2.4.1	Cámaras frigoríficas.....	30
2.4.2	Desecantes.....	30
2.4.3	Cryopreservación.....	31
2.5	Ensayos sobre conservación de semilla de cacao.....	32
III.	MATERIALES Y METODOS.....	35
3.1	Ubicación.....	35
3.2	Materiales.....	35
3.2.1	Materiales de laboratorio.....	35
3.2.2	Equipos de laboratorio.....	36
3.2.3	Material genético.....	36
3.3	Componentes en estudio.....	36
3.3.1	Contenido de humedad de la semilla (A).....	36
3.3.2	Temperatura de conservación (B).....	37
3.4	Tratamientos en estudio.....	37
3.5	Análisis estadístico.....	37
3.6	Determinación de las observaciones a registrar.....	38
3.6.1	Contenido de humedad de la semilla fresca.....	38
3.6.2	Porcentaje de germinación inicial.....	38

3.6.3 Porcentaje de germinación temporales y final.....	39
3.7 Características del ensayo experimental.....	39
3.8 Metodología.....	40
3.8.1 Pruebas preliminares.....	40
3.8.2 Procedimiento experimental.....	41
IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....	43
V. CONCLUSIONES.....	69
VI. RECOMENDACIONES.....	70
VII. RESUMEN.....	71
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	73
IX. ANEXOS.....	76

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página.
1. Evolución del porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla antes del periodo de conservación.....	43
2. Evolución del porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla, a los 30 días de conservación.....	46
3. Evolución del porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla a los 60 días de conservación	50
4. Evolución del porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla a los 90 días de conservación	54
5. Evolución del porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla, a los 120 días de conservación.....	59
6. Resumen general de la evolución del porcentaje de germinación de la semilla de cacao, sometidos a cuatro contenidos de humedad de la semilla y a 15°C, durante el ensayo.....	62
7. Predicción del porcentaje de germinación de cuatro tratamientos de humedad de la semilla de cacao al 5° y 6° mes de conservación.....	66
8. Evolución de la germinación de la semilla de cacao (%), bajo cuatro contenidos de humedad y un testigo, a los 30 días de conservación....	78

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página.
1. Porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla antes del periodo de conservación.....	44
2. Porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla a los 30 días de conservación.....	47
3. Porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla a los 60 días de conservación.....	51
4. Porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla a los 90 días de conservación.....	55
5. Porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla a los 120 días de conservación.....	60
6. Resumen de la evolución del porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla y a 15°C, durante el ensayo.....	63
7. Predicción del porcentaje de germinación de cuatro tratamientos de humedad de la semilla de cacao en el 5º y 6º mes de conservación.....	67
8. Desmucilaginado de semillas.....	79
9. Secado de semillas.....	79
10. Estufa a 35°C.....	79
11. Tapers con semillas desecadas.....	79
12. Semillas en conservación.....	80
13. Semillas en proceso de germinación.....	80

14. Semillas germinadas a los 7 días después de ser colocadas al ambiente.....	80
15. Germinación de las semillas de cacao de los cuatro tratamientos.....	80

I. INTRODUCCION

El uso de semilla mejorada de alta calidad fisiológica, combinada con técnicas de producción y conservación, ha resultado en mejoras en la productividad y producción de los cultivos alimenticios e industriales.

La conservación de las semillas por un lado, garantiza la seguridad alimentaria y por otro, constituye un seguro contra la pérdida de especies de plantas y de las poblaciones (erosión genética).

La semilla del cacao debido a su alto contenido de humedad y a su sensibilidad al secado artificial, no permiten que ésta sea de fácil y prolongada conservación, ya que pierde muy rápidamente su viabilidad. Esta es la razón por la que se le agrupa dentro de las especies de "semillas recalcitrantes".

Son escasos los ensayos que han tratado de mantener la viabilidad de la semilla de cacao, con resultados poco alentadores. Actualmente, la demanda de uso de semilla botánica (como patrón y/o variedad híbrida), se verá incrementando en el futuro, particularmente en épocas de escasez de semilla (de septiembre a diciembre); de modo que se necesita de una tecnología que garantice ofertar semilla botánica viable, dos o tres meses después de ser cosechadas a lugares distantes y con épocas de siembra definidas por el régimen pluviométrico.

Existe pues la necesidad de generar nuevos sistemas alternativos de conservación de semilla de cacao que ayuden a prolongar su viabilidad y

constituirse en una innovación tecnológica para los semilleristas y sea también accesible para los cacaocultores.

El presente ensayo tuvo los siguientes objetivos:

1. Prolongar la viabilidad de la semilla de cacao a niveles satisfactorios a través de cuatro sistemas de conservación.
2. Comparar la eficacia de cuatro sistemas de conservación de la viabilidad de las semillas de cacao durante los periodos de almacenamiento.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 La semilla y su comportamiento durante la conservación

Las semillas son unidades de diseminación y reproducción sexual de las plantas superiores, procedentes del desarrollo de los óvulos de sus flores. Están compuestas de uno o varios embriones, reservas nutritivas y una o varias capas protectoras originadas a partir de los tegumentos del óvulo, del ovario, de los tejidos de otras partes de las flores, incluso, de la inflorescencia (BESNIER, 1989).

Las semillas de las especies cultivadas se clasifican en dos grandes categorías, dependiendo de su comportamiento durante la conservación y su capacidad de tolerar la desecación, en: semillas ortodoxas y semillas recalcitrantes (ROBERTS, 1973).

a. Semillas ortodoxas. Son semillas que pueden ser secadas y conservadas a bajas temperaturas por periodos largos de tiempo. Dentro de este grupo podemos mencionar al arroz, frijol, maíz, etc.

b. Semillas recalcitrantes. Son semillas que no pueden secarse ni pueden ser conservadas en frío, siendo muy difícil su conservación por más de un año. Hay varias especies tropicales con este tipo de semillas: coco, mango, cacao, té, palto, palma aceitera, entre otros (SEVILLA y HOLLE, 1995).

Posteriormente, HONG y ELLIS, 1996, sugirieron un protocolo que permite clasificar las semillas en las categorías: ortodoxas, recalcitrantes e intermedias,

cuando no se conoce el comportamiento de la especie al almacenamiento para facilitar la toma de decisiones en cuanto a la elección del método de conservación apropiado.

c. Semillas intermedias. Son semillas que sí admiten ser desecadas hasta cierto grado y se conservan a temperaturas relativamente frías (SEVILLA y HOLLE, 1995).

Características del clon CCN-51

En primer lugar se destaca su altísima productividad que llega en muchas haciendas a superar los 50 quintales por hectárea lo que lo convierte en un cultivo rentable para el agricultor costeño carente hoy en día de alternativas seguras.

Es un clon autocompatible, es decir no necesita de polinización cruzada para su adecuada fructificación tal como la mayoría de los clones.

El CCN-51 se caracteriza por ser un cultivar precoz pues inicia su producción a los 24 meses de edad.

Es tolerante a la "Escoba de Bruja" enfermedad que ataca a la mayoría de variedades de cacao destruyendo gran parte de su producción.

Es una planta de crecimiento erecto pero de baja altura lo que facilita y abarata las labores agronómicas tales como poda y cosecha entre otras.

Excelente índice de Mazorca (IM) 8 mazorcas/libra de cacao seco, en comparación con el índice promedio de 12 mazorcas/libra.

Excelente Índice de Semilla: 1.45 gr/semilla seca y fermentada comparado con el índice promedio de 1.2 gr/semilla seca.

Alto índice de Semillas por mazorca: que es de 45, mucho más alto que el promedio normal de 36 semillas por mazorca.

Adaptabilidad: Es un clon cosmopolita que se adapta a casi todas las zonas tropicales desde el nivel del mar hasta los 1.000 sobre el nivel del mar.

Alto porcentaje de manteca (54%) lo que lo hace muy cotizado por las industrias.

Calidad del Cacao: Con buen manejo post cosecha el CCN-51 es de primera calidad para exportación.

2.2 La germinación de semillas

Los principales eventos que ocurren durante la germinación de una semilla sigue el siguiente orden: Imbibición del agua > Activación de los sistemas enzimáticos > inicio del crecimiento embrionario > Fractura mecánica de la cobertura seminal > emergencia de la plántula.

El proceso de la forma descrita tiene una duración que varía para las diferentes especies, y en ocasiones para cultivares de una misma especie. Los

factores ambientales más críticos durante la germinación son: (i) la disponibilidad de agua que debe ser adecuada, (ii), la temperatura, y (iii) la composición de los gases en la atmósfera (SOPLIN, 1988).

a) Absorción de agua

La hidratación es condición indispensable en las semillas para la activación del metabolismo y la subsiguiente germinación. La absorción de agua suele efectuarse en tres fases; una fase inicial de rápida absorción, una fase intermedia en el cual el contenido de agua de la semilla permanece casi constante y una fase final de intensa absorción que está relacionada con el alargamiento de las células y la aparición de las radícula (BESNIER, 1989).

Las proteínas constituyen el principal componente de las semillas que contienen coloides que absorben agua; también lo hacen los mucílagos y las sustancias pépticas; por el contrario, el almidón no interviene en este proceso porque sólo absorbe agua en condiciones ácidas y tras tratamientos a altas temperaturas (BESNIER, 1989).

b) Respiración

Cuando las semillas se humedecen se produce un rápido desprendimiento de los gases absorbidos por los coloides existentes en el grano. A continuación comienza el proceso de respiración.

La respiración se desarrolla en tres fases. En la primera fase existe una rápida absorción de oxígeno. A continuación sobreviene una fase de parada en la que la cantidad de oxígeno absorbido no aumenta; sin embargo sigue produciéndose dióxido de carbono, con la consiguiente subida del coeficiente respiratorio, como consecuencia de un fenómeno de respiración anaerobia o fermentación.

La fase de parada de la respiración termina cuando la radícula rompe la testa, en cuyo momento se produce la libre entrada de oxígeno a la semilla y un rápido aumento de su consumo (BESNIER, 1989).

Las temperaturas entre 25-30°C estimulan tanto los altos niveles de germinación y las tasas rápidas de desarrollo de plántulas en muchas especies, lo cual sugiere una carencia general de dormancia de la semilla en ciertas especies investigadas (PRITCHARD et. al, 2004).

2.2.1 Prueba de germinación

La prueba de germinación es indispensable en los ensayos de semillas. La germinación comienza cuando la semilla aletargada o en reposo, activa la maquinaria bioquímica conservada y se desencadenan los procesos metabólicos. La culminación de la germinación coincide con la iniciación de la actividad fotosintética, lo que altera totalmente el metabolismo de la plántula nacida de la semilla (BESNIER, 1989).

La muestra de trabajo para el ensayo de germinación consiste en la semilla pura separada en un previo análisis de pureza. De esta muestra, bien mezclada, se toman al azar 400 semillas, que se ponen a germinar en cuatro repeticiones de 100 semillas cada una. En algunos casos, cuando se sospecha la presencia de enfermedades transmitidas por las semillas, se usan repeticiones de 50 semillas, a fin de separarlas bien unas de otras en el sustrato de germinación para que las semillas enfermas no infecten a las sanas. Al final del ensayo de germinación se cuentan, para cada repetición, el número de plántulas normales, de plántulas anormales, de semillas duras, de semillas frescas sin germinar y de semillas muertas y se calculan los porcentajes medios (en números enteros) de cada una de estas categorías (BESNIER, 1989).

2.3 Conservación de semillas

La conservación de semillas en su forma primigenia ha sido usada por las diferentes culturas antiguas y ha evolucionado en épocas recientes. La finalidad última es asegurar la disponibilidad de alimentos en épocas de escasez o de conflictos bélicos.

La tecnología de conservación de semillas se sustenta principalmente en la comprensión de los procesos científicos y del conocimiento de las técnicas y procedimientos que se han desarrollado en base a esa comprensión. Esta tecnología incluye:

(i) Comprensión de la relación entre la madurez de la semilla y su almacenamiento, para programar la recolección y usar las técnicas de recolección apropiadas, para asegurar recolecciones de semillas de alta calidad.

(ii) Comprensión sobre cómo se distribuye la diversidad genética en poblaciones de plantas silvestres, para seleccionar estrategias de muestreo apropiadas para asegurar que la recolección de semillas incluya la máxima diversidad genética.

(iii) Comprensión de las relaciones de la humedad de la semilla y cómo lograr el contenido de humedad correcto de la semilla para su almacenamiento a largo plazo.

(iv) Conocimiento de la morfología de la semilla y de cómo limpiarlas sin dañarlas.

(v) Comprensión del comportamiento de la semilla en almacenamiento de modo que se seleccionen las condiciones ideales para la misma.

(vi) Comprensión de los requisitos generales de germinación y las características ecológicas específicas de especies diferentes, para el uso de técnicas apropiadas para interrumpir la dormancia de las semillas (ROYAL BOTANICAL GARDEN, 1997).

2.3.1 Viabilidad de las semillas

La viabilidad de las semillas es el período de tiempo durante el cual las semillas conservan su capacidad para germinar. Es un período variable y depende del tipo de semilla y de las condiciones de almacenamiento.

Los lotes de semilla que tienen inicialmente una viabilidad y una capacidad de germinación altas, presentan en el almacenamiento una longevidad mayor que los que tienen una viabilidad inicial baja. La duración de la vida de las semillas viables está correlacionada con el porcentaje de ellas que germina en el ensayo inicial. Es posible que la viabilidad inicial baja no sea grave cuando las semillas se van a sembrar en un plazo de semanas o meses, pero sólo la semilla de buena calidad debe almacenarse durante largos períodos (Holmes y Buszewicz, 1958; Magín, 1962). En el almacenamiento prolongado de semillas agrícolas con fines de conservación de recursos genéticos se recomienda que no se acepten semillas cuya viabilidad inicial sea inferior al 85 por ciento de la viabilidad que se considera característica de la especie o variedad de que se trate (IBPGR, 1976).

Es muy importante que las semillas almacenadas puedan producir plantas cuando se las siembra en campo. Por lo tanto, las semillas deben tener una viabilidad alta al inicio del almacenamiento y mantenerla durante el almacenamiento. Las semillas con viabilidad inicial alta sobrevivirán también más tiempo en almacenamiento. La viabilidad de las semillas se reduce lentamente al comienzo y luego rápidamente a medida que la semilla envejece. El deterioro excesivo conducirá a la pérdida del material (KAMESWARA et. al, 2007).

2.3.2 Pruebas de viabilidad

En los ensayos de semilla, se trabaja con semilla pura. Esta debe mezclarse bien, y las muestras deben ser de 400 semillas de cada una de las clases que está ensayando tomándolas al azar en 4 replicas iguales de 100 o menos semillas. Los papeles de sustrato pueden ser secantes absorbentes de germinación, papel filtro o toallas de papel (ISTA, 1959).

Actualmente, las pruebas de germinación se complementan con las pruebas de vigor. Esta permite al productor de semillas medir o evaluar el potencial de almacenaje de los diferentes lotes de semillas (MOREIRA, 1988).

El vigor de la semilla es la suma del total de aquellas propiedades de la semilla que determinan el nivel de actividad y la performance de la misma o del lote, durante la germinación y la emergencia de las plántulas. Semillas que muestran buena performance se consideran como de alto vigor, mientras que las que muestran una pobre performance, se consideran de bajo vigor (FUNDEAGRO, 1989).

2.3.3 Métodos para determinar la viabilidad del embrión

2.3.3.1 Prueba topográfica de tetrazolio

El método de tetrazolio indica áreas vivas y muertas del embrión y el endospermo mediante tinción o coloración. El producto químico 2,3,5-trifenil tetrazolium chloride, reacciona al ión de hidrógeno para formar

trifenil formazón rojo. Los iones de hidrógeno se forman solamente en áreas de las semillas donde las enzimas de hidrogenasa están activas, consecuentemente estas áreas se ponen rojas. En algunos casos una gama de colores desde el rojo profundo hasta el rojo pálido, así como una gama de patrones de tinción que se podrán encontrar y la interpretación correcta requiere de experiencia.

2.3.3.2 Prueba de rayos x

El objetivo de la prueba de rayos x es proveer un método no destructivo entre semillas vacías y completas dañadas físicamente por insectos en sus características morfológicas evidentes en una radiografía de rayos x. El método también se puede usar para estudiar el desarrollo y estructura anormales internas.

El método se puede usar con o sin un agente contrastante, por ejemplo BaCl o Cloroformo. Cuando se usa el agente contrastante, la semilla inhibe al agente pero sólo en tejidos muertos permiten entrar al agente. Estas partes del tejido absorben la radiación de los rayos x en forma más intensa y se presentan más claras en la película. La ventaja del método de contraste es una mejor interpretación, pero la semilla se destruye.

2.3.4 Factores que afectan la conservación de la semilla

La semilla se deteriora durante el almacenaje en función del tiempo, la temperatura y el contenido de humedad; se deteriora sobre la planta madre, si se retrasa la cosecha debido al clima húmedo y durante el secado con aire caliente, si el flujo de aire no es el adecuado (HERNANDEZ, 1991).

2.3.4.1 Humedad de la semilla

El contenido de humedad es el factor más importante para determinar la velocidad a la cual las semillas se deterioran, y tiene un impacto considerable en la longevidad de las semillas en almacenamiento en un banco de germoplasma. Incluso, pequeños cambios en el contenido de humedad tienen un gran efecto en la vida en almacenamiento. Es importante determinar el contenido de humedad antes de almacenar las semillas para predecir con exactitud el potencial de vida en almacenamiento que tendrá cada accesión (KAMESWARA et. al, 2007).

Cuando las semillas alcanzan su máximo peso seco o su mínimo contenido de humedad, ésta llega a ser fisiológicamente madura y por tanto, decimos que la semilla tiene la madurez requerida (PRITCHARD et. al 2004).

A contenidos de humedad mayores de 35 %, las semillas no latentes pueden germinar. Si está entre 13 y 35 %, hay calentamiento por

actividad respiratoria de semillas y patógenos. Si está entre 10 a 14 %, la semilla es muy susceptible al daño mecánico. Menos del 4 % de humedad, hay daño de semilla por autoxidación. Mientras más alta sea la humedad inicial de la semilla, más baja deber ser la temperatura de secado (BESNIER, 1989).

La determinación del contenido de humedad se hace con el fin de ver si es necesario o no someterla a la semilla a un proceso de secado y estimar las condiciones de almacenamiento. Niveles altos de contenido de humedad están relacionados con tasas de deterioro acelerado (FUNDEAGRO, 1989).

El contenido de humedad de una muestra de semilla, es la pérdida de peso cuando ésta se somete a secamiento, o la cantidad de agua colectada si la muestra se ha destilado, de acuerdo a los métodos existentes normados por el ISTA (MOREIRA, 1988).

2.3.4.2 Temperatura

En las semillas ortodoxas el deterioro de la semilla está en función de la temperatura y el contenido de humedad de la semilla. Se puede alargar la vida de la semilla controlando estos factores. A menor temperatura de la semilla, mayor la longevidad.

La longevidad de las semillas de especies tropicales varía de pocas semanas a varios meses. Son muy sensibles al frío, no pueden soportar temperaturas debajo de 0 °C (SOPLIN, 1988).

Atendiendo a la longevidad de las semillas, es decir, el tiempo que las semillas permanecen viables, pueden haber semillas que germinan, todavía, después de decenas o centenas de años, como es el caso de semillas con cubierta seminal dura como las leguminosas. En general, la vida media de una semilla se sitúa entre 5 y 25 años. Las semillas pierden su viabilidad por causas muy diversas. Podríamos pensar que mueren porque agotan sus reservas nutritivas, pero no es así, sino que conservan la mayor parte de las mismas cuando ya han perdido su capacidad germinativa (FIGUEREIDO, 1986).

Una semilla será más longeva cuanto menos activo sea su metabolismo. Esto a su vez origina una serie de productos tóxicos que al acumularse en las semillas produce un efecto letal para el embrión. Para evitar la acumulación de esas sustancias bastará disminuir aún más su metabolismo, con lo cual habremos incrementado la longevidad de la semilla. Reducir el metabolismo puede conseguirse bajando la temperatura y/o deshidratando la semilla. Las bajas temperaturas dan lugar a un metabolismo mucho más lento, por lo que las semillas conservadas en esas condiciones viven más tiempo que las conservadas a temperatura ambiente. La deshidratación también alarga la vida de las semillas, más que si se conservan con su humedad normal. Pero la desecación tiene unos límites; por debajo del 2%-5% en contenido de humedad,

se ve afectada el agua de constitución de la semilla siendo perjudicial para la misma. En resumen, podemos decir que, para alargar más tiempo la vida de una semilla, ésta debe conservarse bajo condiciones de bajo contenido de humedad, dentro de unos límites; temperaturas bajas y, reducir al mínimo la presencia de oxígeno en el medio de conservación (FIGUEREIDO, 1986).

2.3.4.3 Tolerancia a la desecación de las semillas

En ciertas especies, el umbral de respuesta a la desecación, puede ocurrir a diferentes contenidos de humedad. En *Azadirachta indica* var *siamensis*, los lotes de semillas procedente de muchos de los árboles individuales muestreados mostraron germinación mejorada después de un secado a corto tiempo (unos pocos días), a 45.5% de contenido de humedad, siendo el efecto más evidente con semillas cosechadas a 8 semanas, aproximadamente (PRITCHARD et. al, 2004).

En un estudio de 25 especies vegetales se evidenció alguna sensibilidad a la deshidratación bajo contenido de humedades superiores. Tales sensibilidades se concentraron principalmente en el rango de contenido de humedad de 20-30%. A un punto medio para la pérdida de viabilidad en semillas recalcitrantes, a menudo ha sido observado en esta región de exploración del contenido de humedad, v.g. para *Vitellaria paradoxa*. (PRITCHARD et. al, 2004).

En *Prunus africana*, las semillas “inmaduras” tuvieron >80% de incremento en la germinación después del secado a casi 10% de contenido de

humedad; el incremento fue mucho menos (aprox. 20% de germinación), en las semillas “maduras”. En contraste, a un nivel similar de desecación, resultó en un incremento de alrededor del 40% de germinación, para *Gmelina arborea*. Sin embargo, en estas especies hubo un efecto similar en los testigos (sin secar), sugiriendo que el tiempo fue también un factor en la respuesta (PRITCHARD et. al, 2004).

Se hacen necesarios estudios para evaluar la relativa tolerancia de las semillas bajo condiciones de banco de genes, específicamente, el secado y el almacenamiento en frío. Tales evaluaciones pueden progresar a varios niveles de complejidad. Pequeños lotes de semillas pueden ser tamizados rápidamente para tolerancia a la desecación (PRITCHARD et. al, 2004).

2.3.4.4 Gases

La mayor parte de las semillas requieren para su germinación un medio suficientemente aireado que permita una adecuada disponibilidad de O₂ y CO₂. De esta forma el embrión obtiene la energía imprescindible para mantener sus actividades metabólicas (ISTA 1959).

La mayoría de las semillas germinan bien en atmósfera normal con 21% de O₂ y un 0.03% de CO₂. Sin embargo, existen algunas semillas que aumentan su porcentaje de germinación al disminuir el contenido de O₂ por debajo del 20%. Los casos mejor conocidos son: *Typha latifolia* (“espadaña”) y *Cynodon dactylon* (“grama dulce”), que germinan mejor en presencia de un 8% de

O₂. Se trata de especies que viven en medios acuáticos o encharcados, donde la concentración de este gas es baja. El efecto del CO₂ es contrario al del O₂, es decir, las semillas no pueden germinar si se aumenta la concentración de CO₂.

Para que la germinación tenga éxito, el O₂ disuelto en el agua de imbibición debe poder llegar hasta el embrión. A veces, algunos elementos presentes en la cubierta seminal como compuestos fenólicos, capas de mucílago, macroesclereidas, etc., pueden obstaculizar la germinación de la semilla porque reducen la difusión del O₂ desde el exterior hacia el embrión.

Además, hay que tener en cuenta que, la cantidad de O₂ que llega al embrión disminuye a medida que aumenta disponibilidad de agua en la semilla. A todo lo anterior hay que añadir que la temperatura modifica la solubilidad del O₂ en el agua que absorbe la semilla, siendo menor la solubilidad a medida que aumenta la temperatura (SOPLIN, 1988).

2.3.4.5 Estado de la semilla

Aun en las condiciones de almacenamiento ideales, la semilla pierde enseguida su viabilidad si desde el principio no se encuentra en buen estado. Los factores que hay que tener en cuenta son los siguientes:

a) Madurez de la semilla

Las semillas plenamente maduras conservan su viabilidad durante más tiempo que las semillas que se recolectan inmaduras. La inmadurez

de la semilla puede contribuir a un pobre desenvolvimiento de la misma (PRITCHARD et. al, 2004).

Es posible que determinados compuestos bioquímicos que son esenciales para conservar la viabilidad no se formen antes de las fases finales del proceso de maduración de la semilla. Entre ellos figuran en algunas especies unos compuestos que inducen la latencia, y ésta aparece a veces asociada con la longevidad de la semilla.

b) Efectos parentales y del tiempo

En la recolección de semillas, la cantidad y la calidad suelen ir juntas. El porcentaje de semillas viables en un árbol padre de alto rendimiento suele ser más elevado que en un árbol de escasa producción. Análogamente, un determinado árbol padre tendrá un porcentaje de semillas viables más alto en un año de semilla bueno que en un año escaso. Es probable que las semillas recolectadas de árboles padres de alto rendimiento en un año bueno de semilla sean las que tengan una vida más larga en condiciones de almacenamiento.

c) Ausencia de daño mecánico

Las semillas que resultan dañadas mecánicamente durante la extracción, limpieza, etc. pierden enseguida su viabilidad. El peligro es máximo en las especies que tienen la cubierta seminal delgada o blanda. El calor excesivo

durante la extracción o el secado daña también la semilla. Hay que procurar que durante la preparación de la semilla para el almacenamiento se empleen los tiempos mínimos, las temperaturas más bajas y las velocidades de máquina mínimas que sean necesarias (STEIN et. al, 1974).

d) Ausencia de deterioro fisiológico

La manipulación deficiente en el bosque, durante el tránsito o durante el procesamiento deteriora fisiológicamente las semillas aun cuando no existan daños mecánicos o por hongos. Las semillas ortodoxas deben disponer de ventilación suficiente para evitar la respiración rápida y el recalentamiento, mientras que a las semillas recalcitrantes hay que protegerlas de un secado excesivo.

e) Ausencia de hongos e insectos

En el caso de las especies que se almacenan a temperaturas bajas y con un contenido de humedad bajo, las propias condiciones de almacenamiento deben evitar la aparición de hongos e insectos. No obstante, es necesario evitar recolectar cosechas que presenten una alta incidencia de ataques de hongos o insectos y efectuar todas las operaciones de recolección, transporte, procesamiento, etc. con la mayor rapidez posible a fin de asegurar que la semilla no resulte ya dañada antes de iniciar el almacenamiento. No puede recomendarse en general el tratamiento con fungicidas, pues puede ser perjudicial para las semillas. Muchos fungicidas son eficaces únicamente si se aplican

disueltos en agua, y por lo tanto no son adecuados para el almacenamiento en seco. Los insectos suelen morir cuando se secan las semillas a temperaturas superiores a 40–42°C, y para matar insectos se suelen emplear también el bromuro de metilo y el bisulfuro de carbono (BOLAND et. al, 1980).

2.4 Sistemas de conservación de semillas

2.4.1 Cámaras frigoríficas

La temperatura es uno de los factores más importantes medioambientales que afectan la longevidad de las semillas. Para la mayoría de las especies, cuanto menor es la temperatura de almacenaje al interior de una cámara frigorífica, mayor será el tiempo que las semillas mantendrán su poder germinativo.

Se ha reportado, que la vida de la semilla se reduce a la mitad, sea por cada 5°C de aumento de temperatura de almacenaje, o por cada 1 % de aumento en el contenido de humedad de la semilla. Sin embargo, se hace énfasis en que no debe utilizarse temperaturas inferiores a 0°C o superiores a 50°C (ISTA, 1959).

2.4.2 Desecantes

El número de días requerido para bajar la humedad de la semilla depende del tamaño de la semilla, la humedad inicial, la clase de semilla, y la proporción peso de sustancias desecantes (SEVILLA y HOLLE, 1995).

Varios desecantes se han recomendado para el secado de la semilla con resultados variados; sólo la sílica gel ha demostrado ser útil para el secado de muestras pequeñas. La sílica gel tiene la ventaja que cambia el color cuando se humedece. El color seco es azul; si cambia a rosado debe secarse o cambiarse por una muestra seca para mantener su poder desecante (SEVILLA y HOLLE, 1995).

Cuando la humedad inicial es muy alta, por ejemplo 60%, la proporción sílica gel/semilla es muy importante. Si la proporción es 1/1 durante los primeros 4 días, baja de 60% a 52%; con una proporción de 3:1 baja de 60% a 33% (SEVILLA y HOLLE, 1995).

2.4.3 Cryopreservación

La cryopreservación es un novedoso método de conservación de propágulos vegetales a temperaturas ultrabajas. Conforme se reduce la temperatura de un tejido, el metabolismo celular se reduce. A menos de 150 °C, los procesos bioquímicos cesan por completo, y por lo tanto también las causas de la inestabilidad genética.

El proceso de cryopreservación comprende los siguientes pasos: (i) aislamiento del tejido; (ii) enfriamiento; (iii) congelación; (iv) almacenamiento para la conservación; (v) precalentamiento; (vi) regulación y crecimiento de las plantas (SEVILLA y HOLLE, 1995).

2.5 Ensayos sobre conservación de semilla de cacao

Las semillas de cacao consisten en dos grandes y gruesos cotiledones con un pequeño eje embrionario y en delgados y membranosos restos de endospermos. En un corte seccional el color de los cotiledones puede variar de blanco a morado. Una característica de la semilla de cacao es su relativamente alto contenido de agua, de 35 - 50 %. Esta tiene que mantenerse para que las semillas conserven su viabilidad por unas pocas semanas más (DUFFUS, 1980).

Swarbrkick (1965), citado por FIGUEREIDO, 1986, observó que las semillas con pulpa germinaban más lentamente que aquellas sin pulpa, sugiriendo la presencia de un agente inhibidor de la pulpa, posiblemente el ácido abscísico (ABA).

En un estudio posterior sobre el fruto y la semilla del cacao, los análisis histoquímicos del mucílago (pulpa) envolvente de la semilla y de la fisiología de la germinación, no se mostraron evidencias de la presencia del inhibidor: ácido abscísico (ABA), en la pulpa de la semilla; y la temperatura de 30°C, permitió un completo desarrollo de la plántula en un menor periodo de tiempo, en tanto, que a 35°C ocurrió mayor velocidad de emisión del eje embrionario y la raíz primaria, y el hipocotilo se tornó oscuro y devino en necrosis (FIGUEREIDO, 1986).

Investigaciones preliminares de mantenimiento de la viabilidad de la semilla de cacao permitieron recomendar la necesidad de usar temperaturas cercanas a los 20°C para mantener la viabilidad de la semilla. Dada las condiciones climáticas

de las regiones cacaoteras, el uso de temperaturas controladas implica costos elevados por adquisición de equipos y dificultades de manejo y transporte. Debido a ello, las investigaciones se están enfocando hacia la búsqueda de alternativas prácticas de almacenamiento a temperaturas que permitan conservar, al menos un 70% de la viabilidad durante un mes (SANCHEZ y VELASQUEZ, 1989).

En el cacao, la almendra sin cutícula se conserva mejor que cuando ésta está prendida. Esto quizá se debe a la película delgada de polietilenglicol (PEG) que se forma sobre la semilla (SANCHEZ y VELASQUEZ, 1989). Esta película permite solamente un mínimo de intercambio de oxígeno y mantiene la presión osmótica adecuada para lograr un balance de agua entre absorción y deshidratación de la semilla; lo cual no ocurre igual en la almendra con mucílago. Probablemente, aunque permeable, la cutícula representa una barrera más que interfiere en el intercambio gaseoso y disminuye la presión osmótica (MUNFORD y BRETT, 1982).

En Indonesia, al evaluar los efectos de las condiciones de almacenamiento a diferentes niveles de humedad relativa se encontró que las semillas del clon DR – 2 a humedades relativas de 35%, 75% y 100 % disminuyó el contenido de manteca y se incremento el contenido de azúcares y ácidos grasos. El almacenamiento de las semillas a 100% y 35 % de humedad relativa durante 50 días arrojó 98.3% y 20 % de germinación, respectivamente. En otro ensayo al evaluar el almacenamiento de semillas de cacao del clon DR – 2, bajo condiciones anaeróbicas y aeróbicas se encontró pérdida de su viabilidad a los 20 días,

mientras que en condiciones aeróbicas la viabilidad fue del 70 % después de 20 días de almacenamiento (MONERA – PERKEBUMAN, 1987).

En un ensayo de conservación de semillas de cacao tratadas con una mezcla de Benlate y Thirán y guardadas en bolsas de polietileno, se reporta que después de 24 meses, el 50 % de las semillas germinaba (SEVILLA y HOLLE, 1995).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Ubicación

El presente ensayo se realizó en los Laboratorios de Suelos, Semillas y Micropropagación in Vitro, de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, situada a la margen derecha del río Huallaga, provincia de Leoncio Prado, distrito de Rupa Rupa, departamento de Huánuco, cuyas coordenadas geográficas son:

Longitud oeste: 75° 54'

Latitud sur : 09° 45'

Altitud : 660 m.s.n.m.

3.2 Materiales

3.2.1 Materiales de laboratorio

- Platos germinadores
- Termómetro
- Papel periódico
- Envases de plástico
- Depósitos de plástico herméticos

3.2.2 Equipos de laboratorio

- Estufa
- Freezer
- Autoclave
- Campana de desecación
- Balanza analítica

3.2.3 Material genético

Clon CCN 51, de genealogía parcialmente conocida y procedente del Banco de germoplasma de cacao de la UNAS.

3.3 Componentes en estudio

3.3.1 Contenido de humedad de la semilla (A)

$$a_1 = 43.1\% \text{ H}^\circ$$

$$a_2 = 39.2\% \text{ H}^\circ$$

$$a_3 = 30.5\% \text{ H}^\circ$$

$$a_4 = 22.8\% \text{ H}^\circ$$

3.3.2 Temperatura de conservación (B)

$$b_1 = 15^\circ \text{ C}$$

3.4 Tratamientos en estudio

Los tratamientos (sistemas de conservación), son como siguen:

T0: Semilla de cacao 43.1% H° y temperatura ambiente (25° C +2°C)

T1: Semilla de cacao a 43.1% H° y 15° C

T2: Semilla de cacao a 39.2% H° y 15° C

T3: Semilla de cacao a 30.5% H° y 15° C

T4: Semilla de cacao a 22.8% H° y 15° C

En todos los tratamientos las semillas fueron desinfectadas con el fungicida HOMAI (PS) a la dosis de 3gr/Kg de semilla.

3.5 Análisis estadístico

Se estimaron estadísticos de tendencia central (promedio), y la regresión lineal simple. Para éste último se utilizó la siguiente fórmula:

$$b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$a = \bar{y} - bx$$

$$\hat{Y} = a + bX$$

Donde X: El mes que se desea predecir.(CORDOVA ZAMORA, M. 1999).

3.6 Determinación de las observaciones a registrar

3.6.1 Contenido de humedad de la semilla fresca

Se tomó 20 semillas y se secó a la estufa a temperatura baja constante (105°C) por 16 horas.

La determinación de la humedad de la semilla se hizo por diferencia de pesos, empleando la siguiente fórmula:

$$\%H = \frac{PF - PS}{PF} \times 100$$

Donde:

%H : Porcentaje de humedad

PF : Peso fresco de las semilla

PS : Peso secado a la estufa de las semillas

3.6.2 Porcentaje de germinación inicial

Se tomaron 40 semillas por cada tratamiento, dividiéndolas en dos repeticiones de 20 cada una y se colocaron a germinar en bandejas con arena fina desinfectada en autoclave.

3.6.3 Porcentaje de germinación temporales y final

Las frecuencias de evaluación fueron de: 30, 60, 90 y 120 días después de la siembra. Estas eran acompañadas de sus correspondientes pruebas de germinación para determinar, los porcentajes de germinación inicial, parciales y final. Las muestras de 30 semillas de cada tratamiento eran sacadas del freezer cada 30 días y eran sometidas a sendas pruebas de germinación. Se utilizaron 30 semillas por cada tratamiento y sin repeticiones por la falta de mazorcas del clon CCN-51 en la época de ejecución del ensayo y por falta de espacio en los laboratorios para poner a conservación las semillas.

El nivel crítico establecido para el porcentaje de germinación fue de 85% de germinación de las semillas. Valores debajo de este nivel, determinaban el final del ensayo de conservación de las semillas de cacao.

3.7 Características del ensayo experimental

Nº de tratamientos (sistemas de conservación)	: 5 (incluido el testigo)
Nº de semillas por tratamiento	: 120
Nº de semillas por repetición	: 30
Total de semillas	: 600

3.8 Metodología

3.8.1 Pruebas preliminares

Con el objetivo de obtener diferentes porcentajes de humedad de la semilla de cacao, mediante el proceso de desecación a la estufa; se hicieron varias pruebas preliminares en donde las muestras fueron sometidas a diferentes tiempos (horas) de exposición a una temperatura constante de 35°C, con el objeto de reducir su alto contenido de humedad. Luego, se seleccionaron 4 contenidos de humedad de la semilla para el ensayo. La selección de los 4 contenidos de humedad de la semilla se hicieron conjuntamente con el asesor de la tesis, con el criterio que no se puede reducir a más de la mitad el contenido de humedad de la semilla de cacao por ser una semilla recalcitrante y es muy sensible a la desecación, y a partir de ahí se dividieron en 4 tratamientos conforme las pruebas preliminares avanzaron.

Luego, muestras de éstos 4 tratamientos (contenidos de humedad de la semilla), fueron almacenadas a una temperatura de 10°C y 15°C, para evaluar la viabilidad de las semillas a 30 días de almacenamiento en el freezer. Se encontró que a la temperatura de 10°C, no hubo germinación de las semillas de cacao (muertas por la sensibilidad la frío), y sí elevados porcentajes de germinación a 15°C. En consecuencia, se tomó la decisión de sólo ensayar a esta última temperatura.

3.8.2 Procedimiento experimental

Las actividades desarrolladas en el presente ensayo; así como, su descripción, se detallan a continuación:

Cosecha

Se cosecharon mazorcas del clon CCN-51 fisiológicamente maduras, de las que fueron extraídas sus semillas mediante corte longitudinal de la mazorca con un machete.

Desmucilaginado

Las semillas se colocaron en un envase de plástico con aserrín y se procedió al desmucilaginado mediante frotación de las mismas con el aserrín hasta que éstas quedaran sin mucílago.

Lavado y aireado

Se procedió al lavado con abundante agua; luego se secaron con papel periódico y se procedió a arearlas al ambiente.

Secado en estufa

Luego, las muestras de 20 semillas fueron pesadas para determinar su peso fresco, colocándolas en la estufa a 35 °C, por diferentes tiempos (horas) hasta obtener los contenidos de humedad requeridos para los tratamientos a

ensayar. Estas se obtuvieron mediante una fórmula específica ya mencionada. Los contenidos de humedad seleccionados y el tiempo de exposición a la temperatura de 35°C, fueron los siguientes:

$a_1 = 43.1\% \text{ H}^\circ$ (contenido de humedad de la semilla fresca, sin sometimiento a la temperatura de desecación, 35°C)

$a_2 = 39.2\% \text{ H}^\circ$ a 6 horas y 30 minutos de exposición a la temperatura de desecación (35°C) 39.2, 30.5, 22.8

$a_3 = 30.5\% \text{ H}^\circ$ a 13 horas de exposición a la temperatura de desecación (35°C)

$a_4 = 22.8\% \text{ H}^\circ$ a 15 horas de exposición a la temperatura de desecación (35°C)

Una vez obtenidos los contenidos de humedad requeridos se procedió a la siembra de las semillas en arena fina tratada para lo cual se evaluó el porcentaje de germinación inicial de las semillas antes de ser introducidas en el freezer para su conservación a 15°C.

Después del periodo de evaluación del ensayo (120 días), se hizo una predicción de las respuestas a esperar (porcentaje de germinación), mediante una regresión lineal simple hasta los 180 días (6 meses de conservación), a partir de los datos obtenidos hasta los 120 días (4 meses de conservación).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 1 y Figura 1 se muestra los resultados de 4 tratamientos con relación al porcentaje de germinación obtenido a partir del 5° hasta el 11° día después de la siembra.

Cuadro 1. Evolución del porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla antes del periodo de conservación.

DDS	Humedad de la semilla				Prom.
	43.1 % (T1)	39.2%(T2)	30.5%(T3)	22.8%(T4)	
5	67	70	73	77	72
6	73	70	87	90	80
7	77	73	87	97	84
8	83	87	97	97	91
9	90	93	97	100	95
10	100	93	100	100	98
11	100	100	100	100	100

DDS= Días después de la siembra

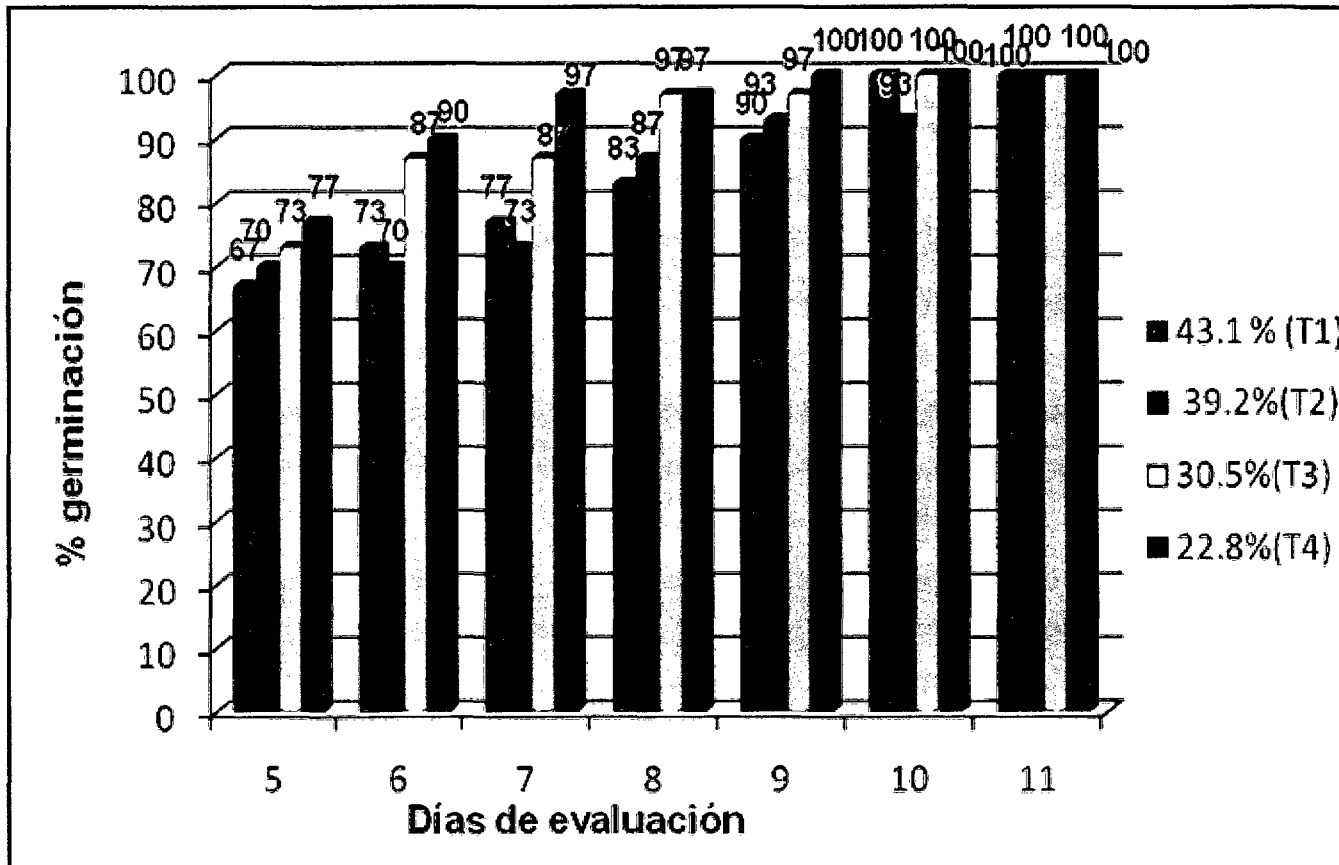


Figura 1. Porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla antes del periodo de conservación

Como se puede observar, las muestras de semillas de cacao de los cuatro tratamientos (contenidos de humedad) que fueron sometidas al proceso de germinación, presentaron un 100% de germinación de las semillas al 11º día después de la siembra. El tratamiento T4 (22.8% de Hº), alcanzó el 100% de germinación de las semillas de cacao, dos días antes que los demás tratamientos (9º día después de la siembra).

Si bien el incremento en el porcentaje de germinación de las semillas fue de forma gradual durante todo el proceso de germinación, el tratamiento T4 (22.8% de Hº), destacó por su mayor velocidad germinativa y porcentaje de germinación comparada con los demás tratamientos. El tratamiento T3 (30.5% de Hº) le siguió en velocidad de germinación y porcentaje de germinación, con un 97% de germinación de las semillas de cacao al 8º día de evaluación, comparado con el tratamiento T1 (43.1% de Hº) y el tratamiento T2 (39.2% de Hº). De estos resultados se puede inferir que a menores contenidos de humedad de la semilla y el estímulo de la temperatura de secado (35°C), habrían actuado como aceleradores del proceso germinativo.

Es posible pensar que en los cuatro contenidos de humedad de la semilla, las respuestas en el porcentaje de germinación de las semillas de cacao, al inicio del ensayo (después del tratamiento de desecación), resultaron ser similares.

En el Cuadro 2 y Figura 2 se muestra que todos los tratamientos obtuvieron resultados satisfactorios en la germinación de las semillas de cacao, llegando todos al 100%.

Cuadro 2. Evolución del porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla a los 30 días de conservación

DDS	Humedad de la semilla				Prom.
	43.1 % (T1)	39.2%(T2)	30.5%(T3)	22.8%(T4)	
5	60	53	80	90	71
6	90	70	93	97	86
7	100	73	93	97	91
8	100	87	93	97	95
9	100	87	93	97	95
10	100	93	100	97	98
11	100	93	100	97	98

DDS= Días después de la siembra

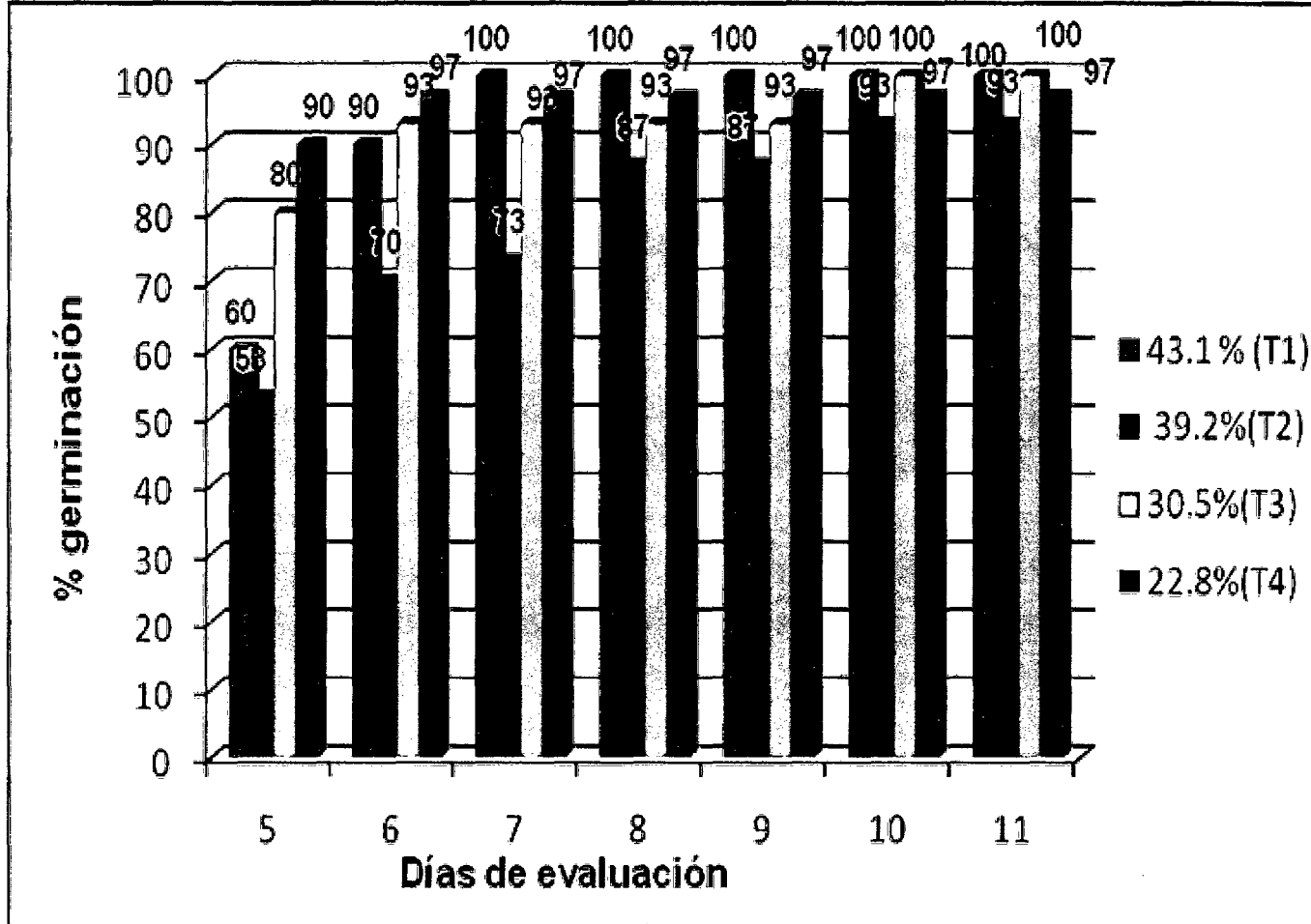


Figura 2. Porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla a los 30 días de conservación

De los resultados obtenidos se puede inferir que las semillas de cacao con diferentes contenidos de humedad almacenadas a 15°C durante 30 días (1 mes), no afectaron la actividad del embrión; sin embargo, se puede señalar que a menores contenidos de humedad, tales como el T3 (30.5% de H^o) y el T4 (22.8% de H^o), la germinación de las semillas de cacao ocurre con mayor rapidez, alcanzando valores cercanos al 100% de germinación al 6° día después de la siembra, al compararse con el T1 (43.1 % de H^o) que llegó alcanzar el 87 % de germinación.

El sometimiento de las semillas de cacao a la temperatura de 35°C a los diferentes periodos de desecación, estaría favoreciendo a una mayor tasa germinativa de las semillas en los primeros días de la germinación, infiriéndose que habría una mayor energía germinativa en los tratamientos con menores contenido de humedad, tales como el T3 (30.5% de H^o) y el T4 (22.8% de H^o).

El tratamiento T2 (39.2% de H^o) comparado con los demás tratamientos, fue el más afectado en la germinación de las semillas alcanzando valores cercanos al 100 % recién en el 11° día del proceso de germinación.

Es posible que el efecto del tiempo de conservación empezaría a afectar la germinación de las semillas de cacao, siendo más evidente en el tratamiento T2 (39.2% de H^o), lo cual podría explicarse por el contenido de polifenoles que contiene la semilla de cacao y que determina una reducción de la viabilidad, tal como lo señala WANG, 1974.

Los cuatro contenidos de humedad de la semilla de cacao al alcanzar valores de germinación de 100% y valores cercanos a éste, a los 30 días de conservación, permiten tener resultados satisfactorios en la conservación de la viabilidad de la semilla del cacao.

En el Cuadro 3 y Figura 3 se observa que a los 60 días de almacenamiento, solo los dos tratamientos con menores contenidos de humedad de la semilla T3 (30.5% de H^o) y T4 (22.8% de H^o), obtuvieron valores muy altos de germinación en los dos primeros días en el proceso de germinación, comparado con los tratamientos T1 (43.1% de H^o) y T2 (39.2% de H^o). Asimismo, alcanzaron el 100% de germinación de las semillas de cacao; más temprano (a los 8 días después de la siembra) en tanto que los tratamientos, sólo alcanzaron un 93% de germinación.

De los resultados obtenidos se puede deducir que las semillas de cacao con diferentes contenidos de humedad conservados a 15°C durante 60 días (2 meses), no afectaron severamente la actividad metabólica del embrión; sin embargo, se puede postular que a menores contenidos de humedad, como los tratamientos T3 (30.5% de H^o) y el T4 (22.8% de H^o), se vieron favorecidas y/o estimuladas para una más rápida germinación de las semillas de cacao, una tendencia algo similar como sucedió a los 30 días del periodo de conservación. Es

así que se alcanzaron valores de 100% T4 (22.8% de H^o) y cercanos al 100% T3 (30.5% de H^o) de germinación al 6^o día después de la siembra, comparado con el T1 (43.1 % de H^o) que llegó alcanzar solo el 87 % de germinación de las semillas.

Cuadro 3. Evolución del porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla a los 60 días de conservación

DDS	Humedad de la semilla				Prom.
	43.1 % (T1)	39.2%(T2)	30.5%(T3)	22.8%(T4)	
4	73	29	87	90	70
5	83	34	93	90	75
6	87	44	93	100	81
7	90	53	93	100	84
8	93	73	100	100	92
9	93	80	100	100	93
10	93	87	100	100	95
11	93	93	100	100	97

DDS= Días después de la siembra

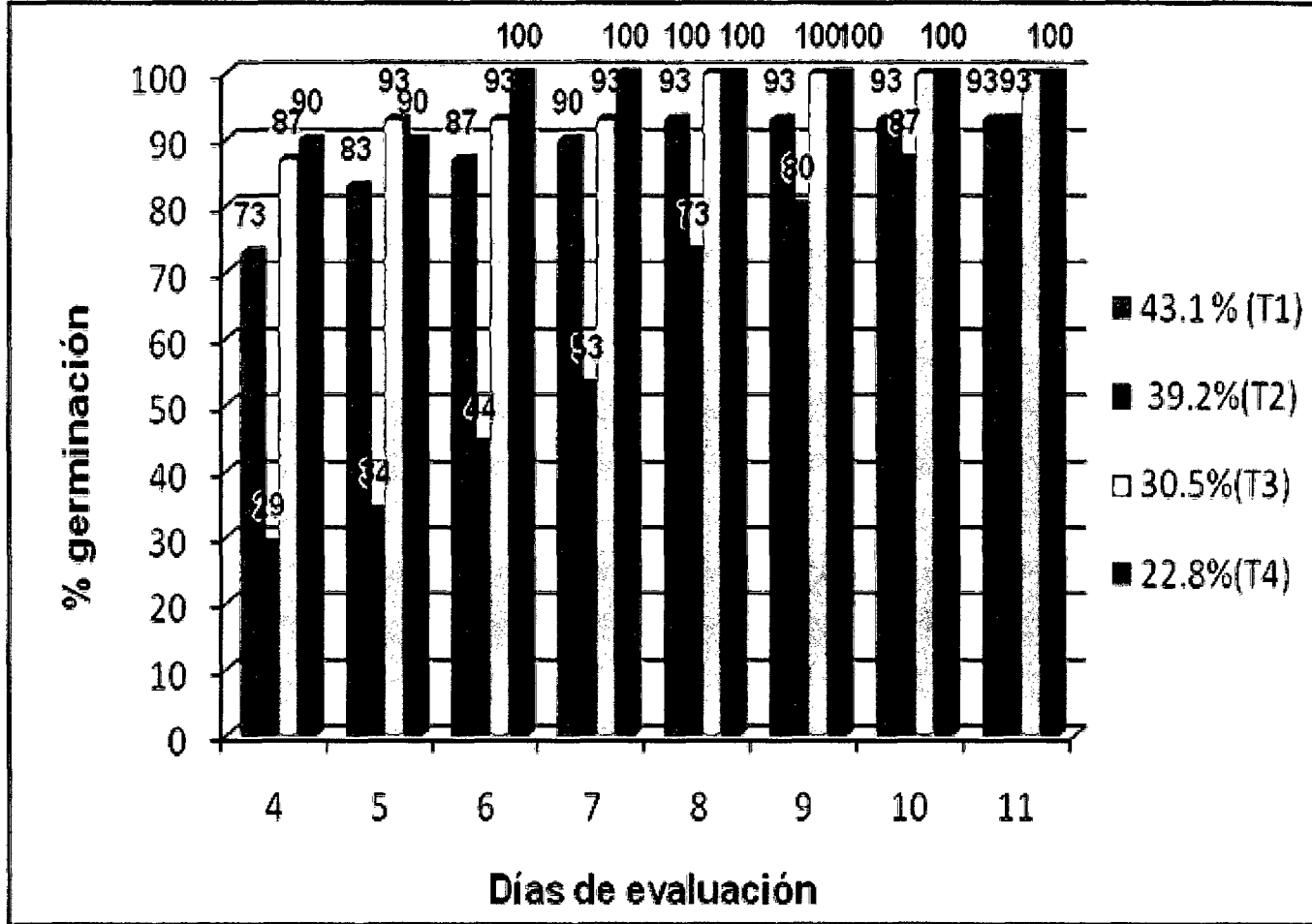


Figura 3. Porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla a los 60 días de conservación

Estos resultados estarían reforzando la aseveración sostenida para los resultados que se muestran en el cuadro 2. El sometimiento de las semillas de cacao a la temperatura de 35°C a diferentes periodos de desecación, el factor temperatura habría estimulado una mayor actividad metabólica (síntesis de enzimas, división celular, translocación de metabolitos orgánicos, entre otros), que luego de un periodo de quiescencia del embrión por causa de la baja temperatura de conservación (15°C), una vez extraídas las semillas de la cámara fría y colocadas bajo adecuadas condiciones de germinación, nuevamente el embrión reanudó su actividad metabólica alcanzó mayor rapidez de germinación en los primeros días de este proceso. La mayor velocidad germinativa ocurrió en los tratamientos con menor contenido de humedad, tal como el T3 (30.5% de H^o) y el T4 (22.8% de H^o). Un comportamiento similar se ha reportado para la semilla de palma aceitera ya que en condiciones naturales, la germinación demora mucho más que cuando se someten a un tratamiento previo de calor en germinadores de aire caliente, con adecuada provisión de oxígeno, y contenido de humedad cercano a la saturación. Es así que cuando éstas son calentadas a 30 – 40°C durante 80 días, con contenido óptimo de humedad relativa y buena aireación, germinan rápidamente a temperatura ambiente (25 + 1°C). El 50% germina en 5-6 días y el resto en 3 semanas.

También es probable que la menor concentración y/o disponibilidad de oxígeno, que si bien es un elemento importante en la germinación de las semillas ya que toma parte en el proceso respiratorio, Tompsett, 1983, citado por KING Y

ROBERTS, 1979, bajo condiciones de conservación en envases cerrados estaría favoreciendo el mantenimiento de la viabilidad de la semilla de cacao, tal como lo ha reportado WANG, 1974 para la semilla de mango, que también es una especie de semilla recalcitrante.

En el tratamiento T2 (39.2% de H^o), los bajos porcentajes de germinación alcanzados en los 3 primeros días, comparado con aquellos obtenidos y mostrados en el cuadro 2, para este tratamiento, se podría explicar por la ocurrencia de un stress por calor (elevación en 1 0 2 grados de la temperatura) debido a la ubicación cercana del lote de semillas a la fuente de radiación calorífica (resistencias eléctricas) que emite la estufa. No obstante, a esto también puede sumarse el factor genético, en la que la variabilidad genética de las semillas se expresaría en un diferente comportamiento en su poder germinativo y vigor.

Cabe destacar que los cuatro contenidos de humedad de la semilla de cacao al alcanzar valores de germinación del 100% y/o valores cercanos a éste (60 días de conservadas), ofrecen resultados satisfactorios para conservar su viabilidad.

De los resultados obtenidos en el Cuadro 4 se puede apreciar que en general, todos los tratamientos de desecación de la semilla T2 (39.2% de H^o) T3 (30.5% de H^o), y T4 (22.8% de H^o) y el tratamiento T1 (43.1% de H^o) sin desecar,

luego de ser conservados a 15°C durante 90 días (3 meses), expresan valores menores de germinación por causa de la afectación de la viabilidad del embrión.

En el Cuadro 4 y Figura 4 se observa que a los 90 días de almacenamiento solamente dos tratamientos (T2 y T3), alcanzaron valores de emergencia de las plántulas de cacao por encima del límite permitido (85%).

Cuadro 4. Evolución del porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla a los 90 días de conservación

Humedad de la semilla					
DDS	43.1 % (T1)	39.2%(T2)	30.5%(T3)	22.8%(T4)	Prom.
5	60	67	67	67	65
6	64	70	70	67	68
7	64	80	77	73	74
8	64	80	83	77	76
9	64	83	83	83	78
10	67	87	87	83	81
11	67	90	87	83	82

DDS= Días después de la siembra

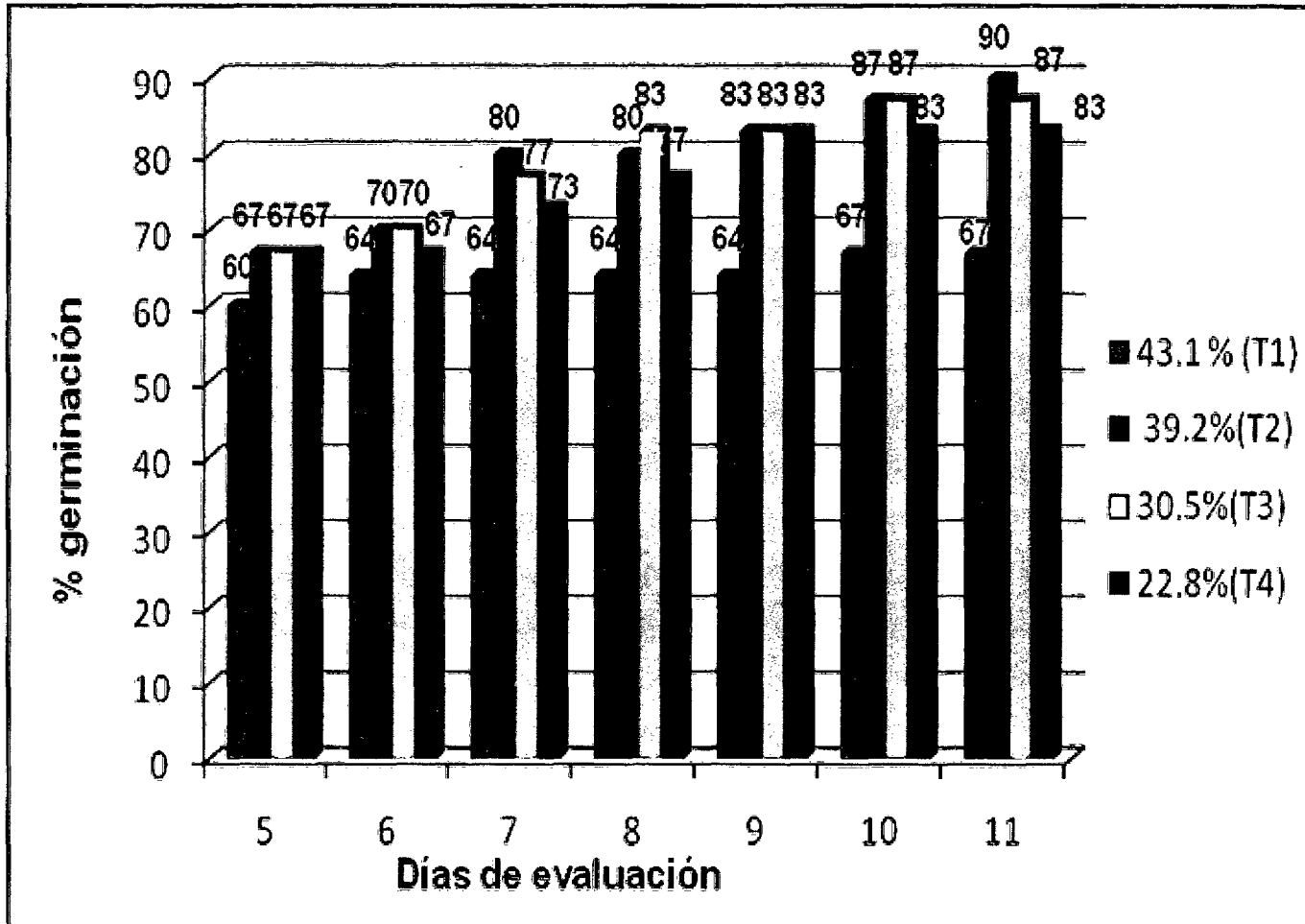


Figura 4. Porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla a los 90 días de conservación

Un factor decisivo y que explicaría estos resultados es el prolongado tiempo de conservación que conlleva a un proceso de envejecimiento irreversible del embrión de la semilla de cacao.

Los porcentajes de germinación obtenidos en los tratamientos T2 (39.2% de H^o) T3 (30.5% de H^o), y T4 (22.8% de H^o), comparado al tratamiento T1 (43.1% de H^o), resultaron ser superiores numéricamente, apoyando y reforzando los reportes científicos de que se logra un mayor periodo de viabilidad de la semilla cuando se reduce el contenido de humedad inicial de la misma y se somete a temperaturas relativamente bajas de conservación, tal como se ha demostrado en la conservación de las semillas ortodoxa (SEVILLA y HOLLE, 1995).

Solamente los tratamientos T2 (39.2% de H^o) y T3 (30.5% de H^o) que alcanzaron valores de 90% y 87% de germinación respectivamente, están aún por encima del nivel crítico establecido (85%) en el 10^o día después de la siembra, comparado con el T4 (22.8% de H^o) y el T1 (43.1% de H^o) y que sólo alcanzaron 83% y 67% de germinación respectivamente.

El tratamiento T1 (43.1 % de H^o) que sólo alcanzó el 67% de germinación, fue el más afectado de todos los tratamientos, atribuyéndose al mayor contenido de humedad de la semilla. El almacenamiento de las semillas debe efectuarse a valores muy próximos al contenido de humedad mínimo seguro (FIGUEREIDO et. al, 1986), pues cuanto más alto sea el contenido de humedad,

aumenta más la tasa de respiración y se acelerará la pérdida de viabilidad de la semilla. Y cuanto más alta es la tasa de respiración, mayor es la cantidad de energía que se libera, con riesgo de recalentamiento y muerte de la semilla (WANG, 1974).

El tratamiento T4 (22.8% de H^o) alcanzó valores (83%) cercano al límite establecido que fue de 85% de germinación, siendo el tratamiento más afectado después del T1 (43.1% de H^o), por el tiempo de almacenamiento y las condiciones de la misma. Es posible que a este nivel de humedad muy bajo para una semilla recalcitrante como es el cacao, sumada al prolongado tiempo de conservación (90 días), haya afectado severamente la viabilidad del embrión. El envejecimiento de la semilla durante el proceso de envejecimiento se expresa en una declinación de la capacidad germinativa y del vigor intrínscico de la misma (BESNIER, 1989). El periodo de almacenamiento, las condiciones de almacenamiento y asociado a esto el envejecimiento fisiológico de las semillas que ocasiona pérdida de las sustancias nutricias por la respiración, pérdida de actividad de los sistemas enzimáticos, deterioro de las membranas celulares semipermeables, alteraciones en el ADN del núcleo celular (ROBERTS, 1973).

En el Cuadro 5 y Figura 5 se puede observar una mayor declinación en los porcentajes de germinación en todos los tratamientos, después de 120 días de conservación de la semilla, comparado con los 90 días después del almacenamiento, no alcanzando ninguno el valor crítico de germinación establecido; i.e, 85%. Sin embargo, los tratamientos T3 (30.5% de H^o) y T4

(22.8% de H^o), aún mantienen valores relativamente altos de germinación, infiriéndose que aún la semilla de cacao mantiene un buen nivel de viabilidad a estos contenidos de humedad y condiciones de temperatura relativamente baja.

Los tratamientos T1 (43.1 % de H^o) y T4 (22.8% de H^o), y bajo las condiciones de temperatura relativamente fría (15°C), dieron valores de germinación más bajos que los otros tratamientos. De acuerdo a un eminente investigador, estos resultados pueden deberse a que algunos cambios fisiológicos que se producen en los tejidos celulares, pueden estar asociados con el envejecimiento fisiológico de las semillas. En consecuencia habría: (1) pérdida de reservas nutricias debida a la respiración, (i.e., disminución de las proteínas y azúcares no reductores, acompañada de un incremento de los azúcares reductores y ácidos grasos libres; (2) acumulación de subproductos de la respiración que son tóxicos o inhibidores del crecimiento; (3) pérdida de actividad de los sistemas enzimáticos; (4) pérdida de capacidad, en las moléculas proteínicas desecadas, para recombinarse y formar moléculas protoplásmicas activas en una rehidratación ulterior; (5) deterioro de las membranas celulares semipermeables; (6) peroxidación de los lípidos, lo que hace que se produzcan radicales libres que reaccionan con otros componentes de la célula y los dañan, y (7) alteraciones en el ADN del núcleo celular, que producen mutaciones genéticas y daño fisiológico (ROBERTS, 1973).

Cuadro 5. Evolución del porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla después de 120 días de conservación

DDS	Humedad de la semilla				Prom.
	43.1 % (T1)	39.2%(T2)	30.5%(T3)	22.8%(T4)	
4	27	57	70	40	49
5	30	60	77	40	52
6	30	60	77	47	54
7	30	67	83	47	57
8	37	67	83	47	59
9	37	77	83	47	61
10	37	83	83	47	63
11	37	83	83	47	63

DDS= Días después de la siembra

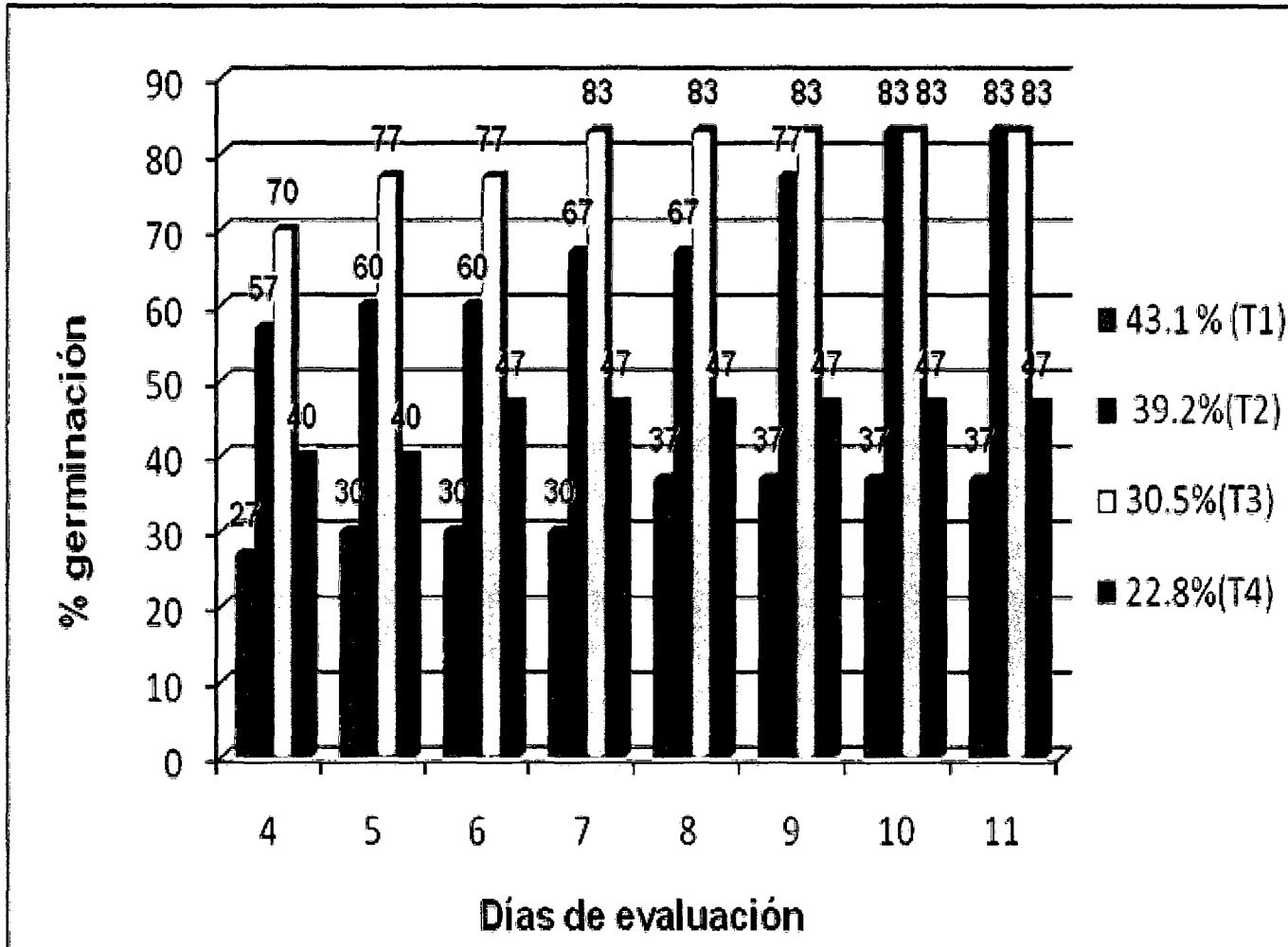


Figura 5. Porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla a los 120 días de conservación

El envejecimiento se produce a causa de los daños que sufren las membranas celulares, organelos, mitocondrias, plastidios, etc.; enzimas y cromatina (ADN y ARNm). Estos daños son muy posiblemente causados por la acción de radicales libres y productos derivados originados por la peroxidación de los lípidos, de las membranas y de las sustancias de reserva, las cuáles actúan directamente durante el envejecimiento en seco o interviene en reacciones producidas en los primeros momentos de la imbibición (ej. la respiración) y que se manifiesta en un retraso de la germinación manifestado por la pérdida de vigor. Si el daño es muy grande o las enzimas que intervienen en las actividades de reparación han resultado dañadas a su vez, la germinación no tiene lugar o la plántula muere (BESNIER, 1989).

En los tratamientos T2 (39.2% de H^o) y T3 (30.5% de H^o) que alcanzaron valores de germinación cercanos al nivel crítico establecido, al 7^o y 10^o día después de la siembra, se puede observar que en este último mes la velocidad de germinación de las semillas de cacao fue muy lenta, tal como se muestra en el cuadro 5. Al contrastar con el cuadro 2, donde se alcanzaron valores cercanos o iguales al 100% de germinación de las semillas de cacao al 6^o y 7^o después de las siembra, se puede sostener que tanto el periodo de conservación, el tratamiento de desecación, y las condiciones de almacenamiento, favorecen y/o desfavorecen la conservación de la viabilidad de la semilla de cacao, en menor o mayor grado, dependiendo de la magnitud de los factores intervinientes.

En el Cuadro 6 y Figura 6 se observa los resultados finales de la germinación de los cuatro tratamientos (contenidos de humedad de la semilla), durante todo el periodo del ensayo.

Cuadro 6. Resumen general de la evolución del porcentaje de germinación de la semilla de cacao, sometidos a cuatro contenidos de humedad de la semilla y a 15°C, durante el ensayo

DDS	Humedad de la semilla				Prom.
	43.1 % (T1)	39.2%(T2)	30.5%(T3)	22.8%(T4)	
0	100%	100%	100%	100%	100
30	100%	94%	100%	97%	98
60	94%	94%	100%	100%	97
90	67%	90%	87%	84%	82
120	37%	83%	83%	47%	63
Final	37%	84%	84%	47%	63

DDS= Días después de la siembra

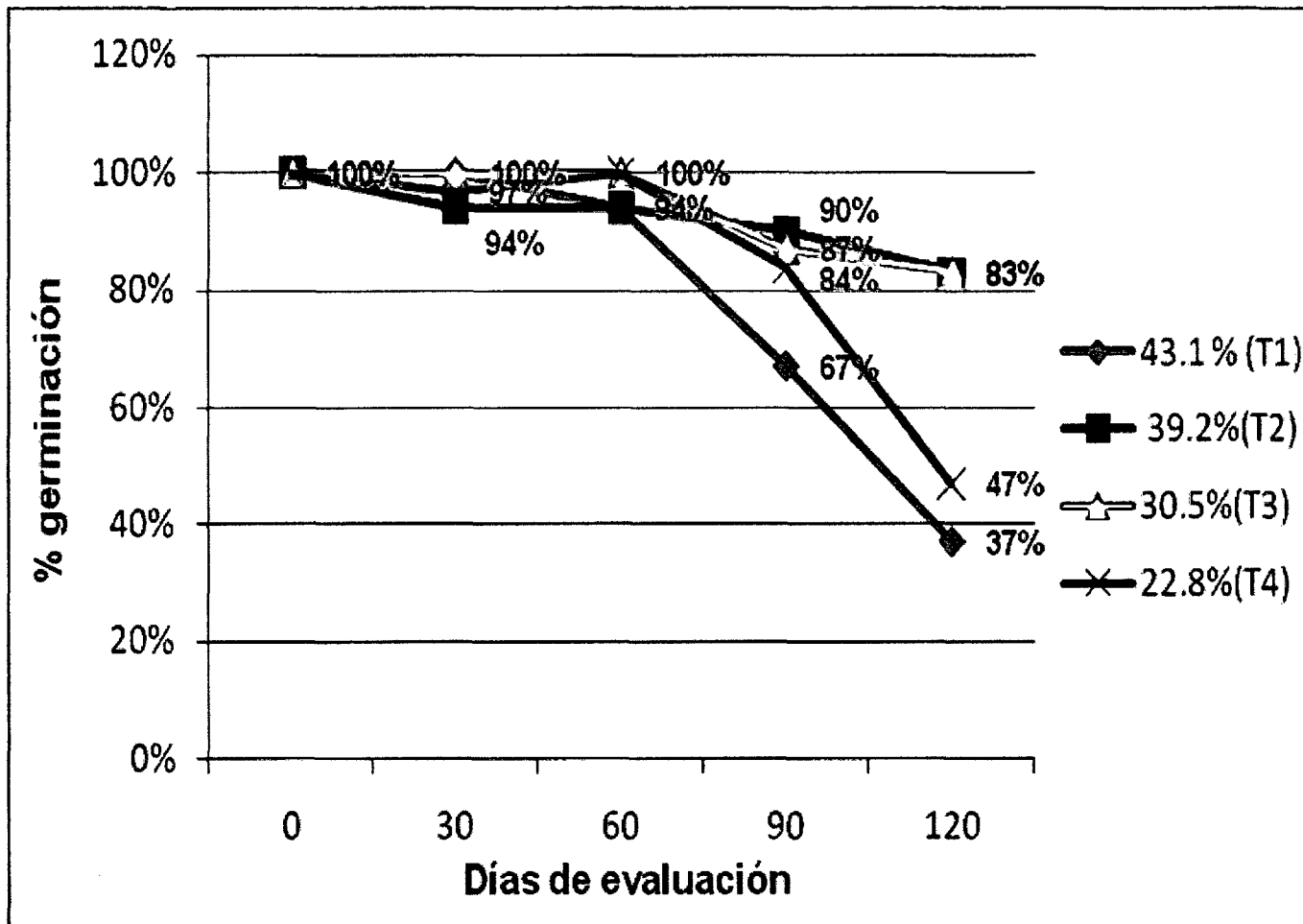


Figura 6. Resumen de la evolución del porcentaje de germinación de la semilla de cacao, bajo cuatro contenidos de humedad de la semilla y a 15°C, durante el ensayo

En el mencionado se puede apreciar en general que los primeros 30 días de conservación de la semilla de cacao con diferentes contenidos de humedad y conservadas a 15°C, se observa ninguna aparente afectación de la actividad del embrión. Todos los tratamientos llegaron al 100 % o cercanos a este valor de germinación de las semillas del cacao, del clon CCN-51. Cabe resaltar que los tratamientos con menores contenidos de humedad de la semilla T3 (30.5% de H^o) y T4, con 22.8% H^o), tuvieron una mayor velocidad germinativa puesto que germinaron en menor tiempo, en comparación con los demás tratamientos; manteniéndose la viabilidad durante el periodo y las condiciones de almacenamiento. Esta misma tendencia se observa a los 60 días de conservación a 15°C, los tratamientos con menores contenidos de humedad de la semilla T3 (30.5% de H^o) y T4, con 22.8% H^o), del clon CCN-51; tuvieron una mayor velocidad germinativa, comparado con los demás tratamientos. Los cuatro tratamientos lograron mantener la viabilidad de la semilla de cacao. A los 90 días conservación a 15°C, todos los tratamientos muestran valores de germinación menores debido a que el embrión se vio afectado en su viabilidad, esto se podría explicar al prolongado periodo de conservación que está asociado a un envejecimiento del embrión de la semilla de cacao. Sólo los tratamientos T2 (39.2% de H^o) y T3 (30.5% de H^o) obtuvieron valores de 90% y 87% de germinación respectivamente, que están por encima del nivel crítico establecido (85%), manteniendo la viabilidad de la semilla de cacao por 90 días de conservación. Como se observa a los 120 días de conservación a 15°C, todos los

tratamientos mostraron valores de germinación por debajo del nivel crítico establecido (85%), tanto el periodo de conservación, el tratamiento de desecación, y las condiciones de almacenamiento influyeron en la viabilidad de la semilla de cacao; mostrando una velocidad de germinación de las semillas de cacao muy lenta, sólo los T2 (39.2% de H^o) y T3 (30.5% de H^o) alcanzaron valores de germinación cercanos al nivel crítico establecido (85%).

Predicción de la germinación hasta los 180 días

La predicción de la germinación a partir de los datos reales obtenidos, hasta los 180 días de conservación se realizó mediante la fórmula de regresión lineal simple mencionada en la metodología por CORDOVA ZAMORA, M. 1999.

En el Cuadro 7 y Figura 7, donde se observa tanto los resultados reales como aquellos predcidos (a los 150 y 180 días de conservación) mediante el método de la regresión lineal simple.

Como se puede observar en el Cuadro 7 y la Figura 7, al realizar la predicción del porcentaje de germinación a partir de los datos reales para el 5^o y 6^o mes de conservación de las semillas de cacao, se evidencia que la viabilidad del embrión continuó reduciéndose, siendo más drástica a los 180 días (6 meses). En la figura 7 se observa que una tendencia lineal negativa en los resultados de germinación,

reales y predecidos, conforme pasa el tiempo de conservación de las semillas de cacao.

Cuadro 7. Predicción del porcentaje de germinación de cuatro tratamientos de humedad de la semilla de cacao al 5º y 6º mes de conservación

Humedad de la semilla					
DDS	43.1 % (T1)	39.2%(T2)	30.5%(T3)	22.8%(T4)	Prom.
0	100%	100%	100%	100%	100
30	100%	94%	100%	97%	98
60	94%	94%	100%	100%	97
90	67%	90%	87%	84%	82
120	37%	84%	84%	47%	63
150	30%	72%	51%	42%	49
180	15%	69%	48%	33%	41
Final	15%	69%	48%	33%	41

DDS= Días después de la siembra

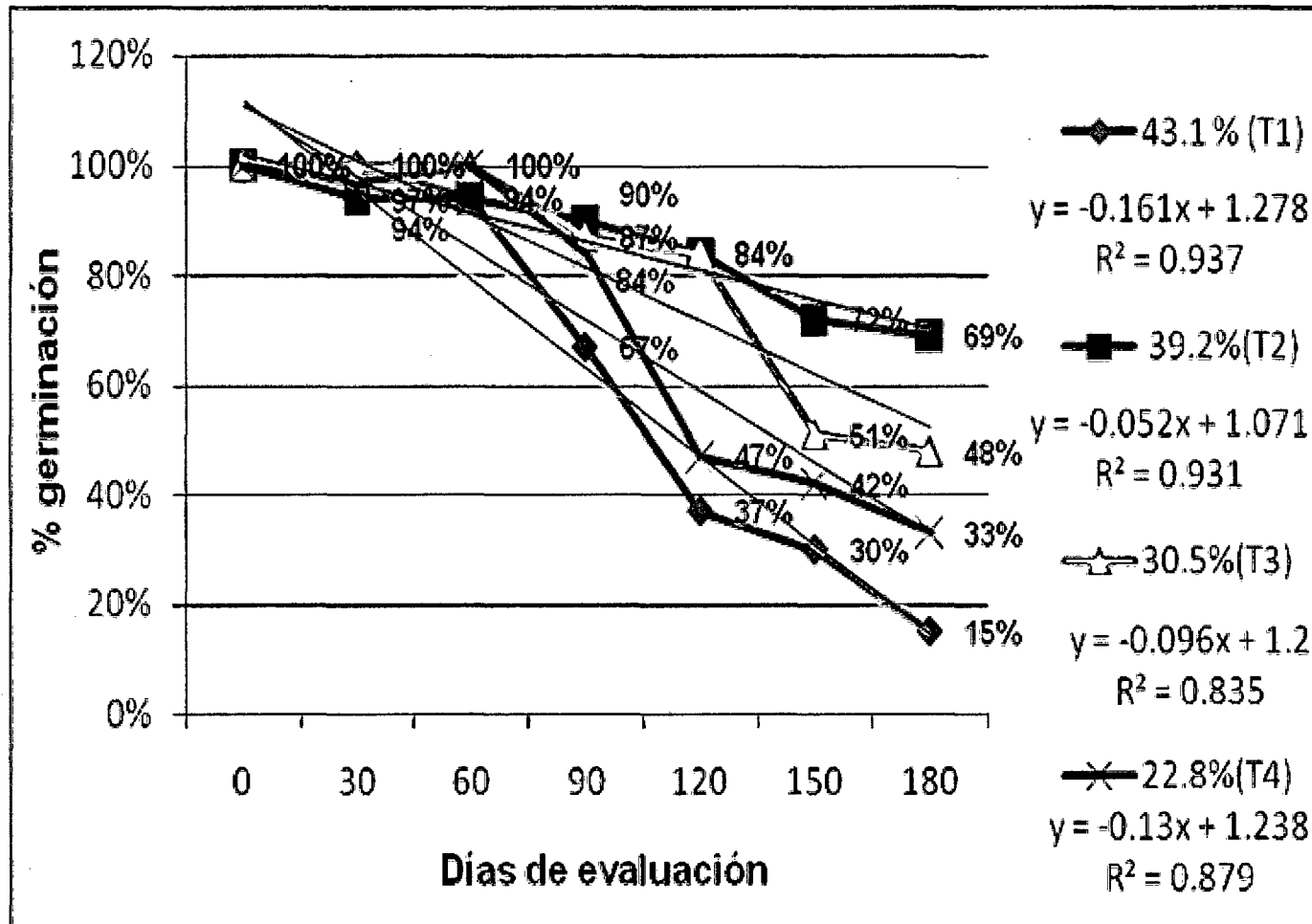


Figura 7. Predicción del porcentaje de germinación de cuatro tratamientos de humedad de la semilla de cacao al 5° y 6° mes de conservación

Las respuestas reales y predecidas se atribuyen al proceso de envejecimiento de la semilla, que estuvo sometida a periodos prolongados de conservación y a diferentes contenidos de humedad de la misma. Aquí se puede resaltar que tanto los tratamientos T1 (43.1% de H^o) y T4 (22.8% de H^o), que tuvieron el más alto y más bajo contenido de humedad de la semilla, mostraron las más drásticas reducciones en su viabilidad. Esto conlleva a sostener y reforzar la tesis de que la semilla de cacao, por ser de tipo recalcitrante, es muy sensible a la reducción drástica de su contenido de humedad inicial (que es alto), y también, que bajo este alto contenido de humedad, se hace difícil la conservación de su viabilidad por periodos mayores de 120 días (4 meses).

IV. CONCLUSIONES

1. Se logró prolongar satisfactoriamente la viabilidad de la semilla de cacao por más de 90 días (>3 meses), cuando fueron sometidas a tratamientos de desecación y conservadas a una temperatura relativamente baja (15°C).
2. Los contenidos de humedad de la semilla: T2 (38% de H^o) y T3 (31% de H^o), del clon CCN-51, alcanzaron el 90% y 87% de germinación, a los 90 días (3 meses) después de su conservación.
3. A los 120 días (4 meses), ningún tratamiento logró superar el nivel crítico establecido (85% de germinación), lo que determinó la finalización del ensayo.
4. Se puede precisar que durante los 60 primeros días (2 meses) de conservación, la germinación de las semillas de cacao del clon CCN-51, no se vio afectada. En cambio, a los 90 y 120 días, su viabilidad fue declinando en forma gradual, siendo más drástica en el tratamiento T1 (43% de H^o), debido a su elevado contenido de humedad de la semilla.

V. RECOMENDACIONES

1. Mientras no existan otros reportes o mejores resultados, se sugiere usar los tratamientos: T2 (38% de H^o) y T3 (31% de H^o) almacenados a 15°C, que permitieron prolongar satisfactoriamente la conservación de la viabilidad de la semilla de cacao por más de 3 meses de almacenamiento.
2. Planificar ensayos de conservación de semillas de cacao, ampliando la región de exploración de los contenidos de humedad de la semilla, incrementando el número de clones; utilizar un inhibidor del crecimiento (ácido absícico), entre otros, con la finalidad prolongar más la longevidad de la semilla de cacao durante el almacenamiento.

VI. RESUMEN

El presente ensayo se realizó con el objetivo de determinar la influencia que tiene la desecación de la semilla de cacao a cuatro contenidos de humedad y su almacenamiento en frío para prolongar la viabilidad de la semilla de cacao del clon CCN-51.

La ejecución de del ensayo incluyó un fase de campo que se realizó en Tulumayo con la recolección de las mazorcas de cacao, y la fase de laboratorio, se realizó en el Laboratorio de Suelos, Semillas y Micropropagación in Vitro, de la Universidad Nacional Agraria de la Selva. Como observaciones registradas se incluyeron: contenido de humedad: T1 (43.1% de H°) T2 (39.2% de H°), T3 (30.5% de H°) y T4 (22.8% de H°) todos almacenados a 15°C, porcentaje de germinación inicial (100%), los periodos de conservación (30, 60, 90, 120 días), el método estadístico (regresión lineal simple) y el valor crítico mínimo de germinación (85%).

Los resultados muestran que el contenido de humedad en la semilla a una T° de 15°C con mayor efecto para la conservación de las semillas de cacao, del clon CCN-51, corresponde a los tratamientos T2 (38% de H°) y T3 (31% de H°), cada uno con un porcentaje de germinación de las semillas de cacao de 83% y 83% respectivamente. Sin embargo los tratamientos T1 (43% de H°) y T4 (28% de H°), no lograron mantener la viabilidad de la semilla de cacao, del clon CCN-51, alcanzando valores de germinación de las semillas de cacao del 37% y 47% respectivamente a los 120 días de almacenamiento.

Para futuros ensayos se hace necesario planificar ensayos de conservación de semillas de cacao, ampliando la región de exploración de los contenidos de humedad de la semilla, incrementando el número de clones; utilizar un inhibidor del crecimiento (ácido absícico), entre otros, con la finalidad prolongar más la longevidad de la semilla de cacao durante el almacenamiento.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. BESNIER ROMERO, F. 1989. Semillas: Biología y tecnología. Ediciones Mundi. Prensa. Madrid (España). 637 p.
2. CORDOVA ZAMORA, M. 1999. Estadística Inferencial – Aplicaciones. Editorial MOSHERA S.R.L. Lima-Perú. 263 p.
3. I.S.T.A. 1959. Deliberaciones de la Asociación Internacional para el Ensayo de Semilla. Reglas Internacionales para el ensayo de semillas. Centro Regional de Ayuda Técnica (AID) México. 128 p.
4. DUFFUS, C. y SLAUGHTER, C. 1980. Las semillas y sus usos. Edit. AGT Editores S.A. México. 188 p.
5. FIGUEREIDO 1986. Conservación de la viabilidad de la semilla de cacao. El tipo de fruto y descripción de la germinación de la semilla. *Thebroma*, 16 (2):76-86.
6. FUNDACION PARA EL DESARROLLO DEL AGRO. 1989. Manual de control de calidad en semillas. FUNDEAGRO. Lima – Perú. 70 p.
7. HERNANDES, T. T. 1991. Cacao. Sistemas de producción en la Amazonía Peruana. Programa de Promoción agroindustrial y desarrollo Rural Alternativo. UNFDAC – PNUD I OSP. Tingo María – Perú. 70 p.
8. HONG, T, D. y ELLIS, R, H. 1996. A protocol determines seed storage behaviour.

9. PRITCHARD, H, SACANDE M y BERJAK, P. 2004. Biological aspects of tropical tree seed desiccation and storage responses. Pág. 319.
10. KAMESWARA R, HANSON, J DULLOO, M, GHOSH, K, NOWELL, D y LARINDE, M. 2007. Manual para el Manejo de Semillas en Bancos de Germoplasma. Roma – Italia.
11. KING, M and ROBERTS, E, H. 1979. The storage of Recalcitrant seed: Achievements and Possible Approaches. International board for Plant Genetic Resources (IBGRI), Rome-Italy.
12. LEON, J. 1975. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. IICA. San José. 375 – 384 p.
13. MANERA – PERKEBUNAN, 1987. Effect of the content of metabolites and the viability of cocoa seeds I. Storage under aerobic and anaerobic conditions. Horticultural abstracts.
14. MOREIRA, N. 1988. Semillas, Ciencia, Tecnología y Producción. Ed. Hemisferio Sur. Montevideo-Uruguay. 406p.
15. MUMFORD, PM; BRETT, A.C. 1982. Conservation of cacao seed. Tropical Agriculture. Pg 306-310.
16. SANCHEZ, J, E. Y VELASQUEZ, A. 1989. Revista Interamericana de Ciencias Agrícolas. Vol. 39. PAG. 483.
17. SEVILLA, R y HOLLE, 1995. Recursos Genéticos Vegetales. UNALM. Lima-Perú.
18. SOPLIN, H. 1988. Semillas de Especies Tropicales. Módulo I. Producción y Manejo. Curso Post Grado del 6-10 de Julio de 1988. Pucallpa.

19. ROBERTS, E, H. 1973. Predicting the storage life of seed. Seed Sci and Sechnol. Pág. 449, 514.
20. ROYAL BOTANIC GARDENS, KEW (RBG KEW), 1997. Millennium Seed Bank Project (MSBP)
21. UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA 2003. Germinación de la Semilla.
22. WANG, B.S.P. 1974 Tree-seed storage. Canadian forestry Service. Publication N° 1335. Ottawa Department of Environment.

VIII. ANEXOS

9.1. Protocolo de determinación del contenido de humedad de la semilla.

Para la determinación del contenido de humedad de la semilla se utilizó dos muestras representativas de 20 semillas cada una las cuales se pesaron en la balanza analítica y se obtuvieron sus pesos frescos luego se las colocó en la estufa a 105 °C por 16 horas, obteniéndose sus peso seco de ambas muestras, luego se procedió a sacar el porcentaje de humedad mediante la siguiente formula:

$$\%PH = PF - PS / PF * 100$$

$$\%PH = 61.18 - 34.67 / 61.18 * 100$$

$$\%PH = 43.331$$

$$\%PH = 58.89 - 33.64 / 58.89 * 100$$

$$\%PH = 42.876$$

El promedio de los dos contenidos de humedad nos dieron el contenido de humedad inicial de la semilla.

$$\%PH = 43.331 + 42.876 / 2$$

$$\%PH = 43.103$$

Cuadro 8. Evolución de la germinación de la semilla de cacao (%), bajo cuatro contenidos de humedad y un testigo, a los 30 días de conservación

Humedad de la semilla					
DDS	43.1 % T(MA)	43.1 % (T1)	39.2%(T2)	30.5%(T3)	22.8%(T4)
5	0	60	53	80	90
6	0	90	70	93	97
7	0	100	73	93	97
8	0	100	87	93	97
9	0	100	87	93	97
10	0	100	93	100	97
11	0	100	93	100	97

T= Testigo

MA= Medio Ambiente

DDS= Días después de la siembra

Las semillas conservadas a medio ambiente empezaron a germinar a los 7 días después de ser colocadas al ambiente, no pudiendo llegar ninguna muestra para la evaluación a los 30 días de conservación.



Figura 8. Desmucilaginado de semillas

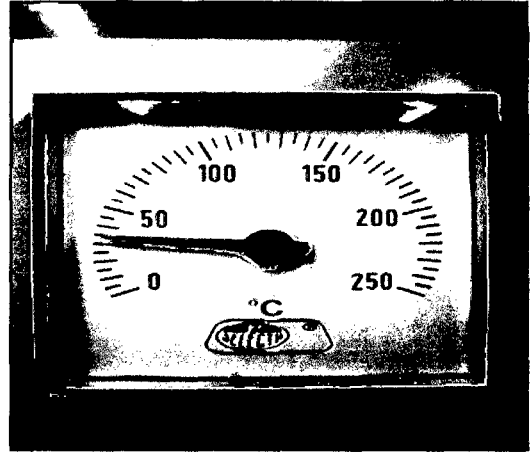


Figura 10. Estufa a 35°C



Figura 9. Secado de semillas a estufa

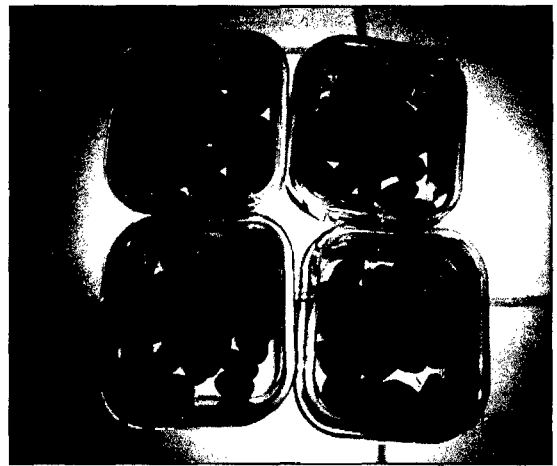


Figura 11. Tapers con semillas desecadas

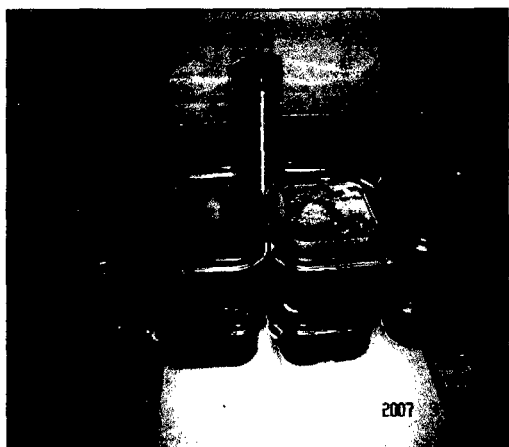


Figura 12. Semillas en conservación



Figura 14. Semillas germinadas a los 7 días después de ser colocadas al ambiente

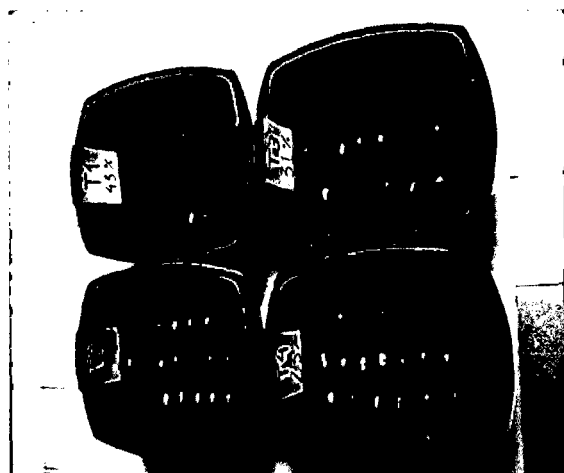


Figura 13. Semillas en proceso de germinación

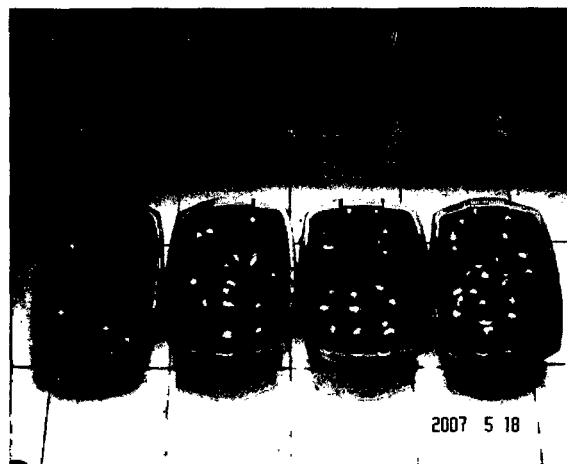


Figura 15. Germinación de las semillas de cacao de los cuatro tratamientos