

# Conservación de las Semillas del Cacao (*Theobroma cacao*)<sup>1</sup>

J.E. Sánchez\*, A. Velázquez\*\*

## ABSTRACT

This study was undertaken at the Rosario Izapa Experimental Site in the State of Chiapas (Mexico), with the aim of proving the capacity of polyethylene glycol (PEG) in conserving the viability of cocoa seeds, and to verify whether the presence of pod pieces, pulp juice or charcoal can be used to delay seed germination. The first part of the study was carried out in Petri dishes with 10 seeds per dish of the RIM-117 clone, using PEG (with molecular weights of 300, 1 500, 3 000, 4 000 and 6 000) in addition to thiram or chlorotoloniol. Later, groups of 100 seeds in polyethylene bags were used with pod pieces, pulp juice and charcoal. After one month's storage at 28°C, the percentage germination was evaluated by seeding on sterile soil. Charcoal was shown to be the best conservation material (72%) in groups of 100 seeds; nonetheless, the percentage germination rate decreased in proportion to an increase in the number of seeds per bag. Storage in an aqueous solution in Petri dishes with PEG-3 000 + thiram conserved 97.5% of seeds without husk. However, this method did not work with polyethylene bags with 100 seeds. The incorporation of pod pieces and pulp juice does not preserve viability.

## COMPENDIO

Este trabajo se realizó en el Campo Experimental Rosario Izapa en el estado de Chiapas, con el propósito de probar la capacidad del polietilén glicol (PEG) en la conservación de la viabilidad de las semillas de cacao y también, si la presencia de trozos de mazorcas, jugo de pulpa o carbón pueden ser usados para retardar la germinación. La primera parte del estudio se realizó en cajas de Petri, con 10 semillas del clon RIM-117 usando PEG (con peso molecular 300, 1 500, 3 000, 4 000 y 6 000) más thiram o clorotoloniol. Posteriormente, se utilizaron lotes de 100 semillas en bolsas de polietileno con trozos de mazorca, jugo de pulpa y carbón vegetal. Al término de un mes de almacenamiento a 28°C, se evaluó el porcentaje de germinación por siembra directa de las semillas en tierra estéril. El carbón vegetal resultó ser el mejor material conservante (72%) en lotes de 100 semillas; sin embargo, a medida que aumentó el número de semillas en la bolsa, disminuyó el porcentaje de germinación. El almacenamiento en cajas de Petri, en medio acuoso, con PEG-3 000 + thiram, conservó el 97.5% de semillas sin cutícula; sin embargo, este método no dio resultado al utilizarse en bolsa de polietileno con 100 semillas. La incorporación de trozos de mazorca y jugo de mucílago no permite preservar la viabilidad.

## INTRODUCCION

**E**n México, el cacao se siembra en los estados de Tabasco (42 000 ha) y Chiapas (32 182 ha). Una dificultad importante, al tratar de transportar semillas a regiones alejadas de las zonas productoras, es la conservación de la viabilidad ya que ésta se pierde en menos de una semana

El Campo Experimental Rosario Izapa, localizado en el estado de Chiapas, produce y distribuye semilla híbrida mejorada de cacao la cual se siembra tanto en las zonas productoras del estado, como en otras zonas de Oaxaca y Veracruz. Tradicionalmente, la semilla se ha transportado en mazorca; sin embargo, este traslado resulta oneroso por el peso y el volumen, la semilla tiene un período corto de viabilidad y el acarreo

facilita la diseminación de enfermedades. En vista de que este Campo Experimental también realiza viajes de recolección de germoplasma, el transporte en mazorca presenta una dificultad más porque obliga a limitar la duración de los viajes al período de tiempo que permite la viabilidad de la semilla.

Investigaciones preliminares hechas en este Campo permitieron confirmar la necesidad de usar temperaturas cercanas a los 20° para mantener la viabilidad de la semilla. Dadas las condiciones climáticas en las regiones productoras de cacao el uso de temperaturas controladas implica costos elevados por adquisición de equipo y dificultades de manejo y transporte. Debido a ello, esta investigación se enfocó hacia la búsqueda de condiciones prácticas de almacenamiento a temperatura ambiente que permitieran conservar, al menos un 70% de germinación durante un mes

Mumford y Brett (5), usando polietilén glicol 6 000, en tres concentraciones, a 25°C y trabajando de manera casi estéril, sin fungicida, lograron conservar la viabilidad de 100% de las semillas, durante 25 semanas. Estos mismos autores sugirieron el uso de thiram para evitar la rigurosidad del trabajo aséptico.

<sup>1</sup> Recibido para publicación el 2 de diciembre 1988.

\* Investigador del Programa Cacao. CERI. Apartado Postal 96 Tapachula, Chiapas, México.

\*\* Tesista del Programa Cacao. Estudiante del área de Ciencias Químicas, Campus IV, Convenio UNACH-INIFAP, México

El carbón vegetal fue usado con éxito, como conservante, por Evans (1), quien colocó semillas perforadas en un recipiente con carbón y conservó el 70% de viabilidad durante 13 semanas.

#### REVISION DE LITERATURA

La conservación de semillas de cacao a temperatura ambiente presenta problemas, ya que el cacao es una semilla recalcitrante que trata de germinar inmediatamente después de ser cosechada. En una etapa anterior de este trabajo, se logró conservar el 75% de semillas a 20°C durante un mes y el 50% a 28°C al mezclar éstas con cascabillo, en presencia de thiram en bolsa de polietileno (6).

La presencia de inhibidores naturales de germinación en el fruto de cacao, ya ha sido estudiada Suter, citado por Forsyth y Quesnel (2), encontró que existe un inhibidor volátil de germinación en la pulpa de cacao el cual permite que el 25% de semillas no peladas, en una caja de Petri, sea suficiente para retardar al menos seis días la germinación del 75% restante de semillas peladas. Por su parte, Holden (3), encontró que la mazorca de cacao contiene un inhibidor de germinación. Mumford y Brett (5), con base en estos resultados, usaron extractos de mazorca para crear condiciones de conservación similares a las que rodean a la semilla recién cosechada; sin embargo, no pudieron conservar las semillas viables por mucho tiempo.

King y Roberts (4), usaron polietilén glicol (PEG) 6 000 en solución acuosa para conservar la viabilidad de la semilla de cacao. Como polietilén glicol o pluracol, se conoce una gama de polímeros líquidos y sólidos con fórmula general  $H(OCH_2 - CH_2)_nOH$  que son solubles en agua y de uso muy variado en la industria. Ellos hicieron pruebas con dos temperaturas y tres concentraciones diferentes de PEG 6 000, con fungizone. Obtuvieron 6.6% al cabo de 24 días de conservación a 20°C y 47% a 15°C después de un mes; sin embargo, manifestaron que probablemente se mejorarían estos resultados con el uso de otro fungicida.

#### MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó entre junio de 1986 y julio de 1987, en las instalaciones del Campo Experimental Rosario Izapa, en donde se presenta una temperatura media anual de 28.8°C y una precipitación de 3 500 a 4 000 mm por año.

##### Materiales

Como material biológico, se usaron semillas frescas, pulpa y restos de mazorca del clon RIM-117. Se

usó polietilén glicol (PEG), fabricado comercialmente como pluracol, con pesos moleculares de 300, 500, 3 000, 4 000 y 6 000. El carbón vegetal se adquirió en el mercado local y para utilizarlo, se trituroó en un molino de nixtamal hasta obtener un polvo fino que se secó al horno durante dos horas a 70°C.

##### Diseño experimental

Se establecieron dos series de experimentos, en la siguiente forma: la primera serie comprendió un total de 21 tratamientos con cuatro repeticiones, bajo un diseño totalmente al azar. En este caso, para formar cada repetición, se colocaron 10 almendras de cacao (con mucilago, sin mucilago o sin cutícula), en una caja de Petri (400 g/l) más fungicida (Clorotalonil 1.5 g/l o thiram 2.5 g/l) (Cuadro 1). El tratamiento sin fungicida ("estéril") se preparó manipulando las almendras de las mazorcas en forma rigurosamente aséptica (a la flama) y mezclándolas con la solución de PEG esterilizada por filtración en filtro Millipore de 0.3 micras.

El periodo de almacenamiento, a la oscuridad y temperatura ambiental (28°C) fue de un mes.

La segunda serie comprendió nueve tratamientos con cuatro repeticiones, también bajo un diseño completamente al azar. En este caso, se colocaron 100 semillas de cacao mezcladas con partes del fruto más fungicida en bolsa de polietileno (Cuadro 4).

Como testigo se usó el método propuesto por Sánchez y Jiménez (6), el cual consiste en guardar, a temperatura ambiente, lotes de 100 semillas sin mucilago, con 50 g de cascabillo seco de café más 80 ml de nitrazán (2.25 g/l), en bolsas de polietileno.

Posteriormente a estos experimentos, se efectuó un ensayo con el mejor conservante (carbón vegetal) para evaluar su eficiencia, utilizando cantidades de 100, 300, 500 y 700 semillas en bolsas de polietileno, durante un mes de almacenamiento.

El porcentaje de germinación de los diferentes tratamientos se calculó de la siguiente manera: para la primera serie de experimentos se sembraron las 10 semillas de cada repetición y para la segunda serie, se sembraron cuatro muestras de 10 almendras en tierra estéril (solución 4:2 de etanol 90% más formol 30%); 15 días después de la siembra, se observó el número de plantas que habían crecido.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro 1 se presenta el porcentaje medio de germinación de las almendras que fueron almacenadas, durante un mes, en una caja de Petri, en presencia de diferentes pesos moleculares de PEG. Se observa que, al final del período de almacenamiento, el mejor tratamiento, según la prueba de Tukey ( $P = 0.05$ ) fue PEG 3 000 estéril que obtuvo el 97.5% de almendras viables sin cutícula, seguido por el PEG 3 000 thiram con almendra sin cutícula (90%).

El uso de fungicida (thiram) es un factor indispensable, desde el punto de vista fitosanitario, ya que redujo la proliferación de hongos que dañan la semilla y reduce su viabilidad. El clorotalonil, además de inhibir el desarrollo de hongos, probablemente inhibió la germinación de las semillas ya que observó un menor porcentaje de germinación para diferentes condiciones de almendra y diferentes pesos moleculares de PEG, con respecto al thiram. El análisis estadístico de parcelas divididas entre el efecto fungicida (parcela grande y el PEG/parcela chica) sobre la almendra sin cutícula, reveló que existen diferencias estadísticas causales por el uso de fungicida. La comparación de la media de los valores de germinación con este análisis señala diferencias altamente significativas en favor del thiram (Cuadro 2).

Cuadro 1. Porcentaje de germinación de semillas de cacao después de un mes de almacenamiento en presencia de polietilén glicol en caja de Petri.

No.	Descripción del tratamiento	% de germinación	
	Semillas	PEG*	
1	Sin cutícula	3 000 e	97.5 a
2	Sin cutícula	3 000 t	90.0 ab
3	Sin cutícula	4 000 t	85.0 bc
4	Sin cutícula	6 000 t	81.8 bed
5	Sin cutícula	1 500 t	80.0 bcde
6	Sin mucílago	6 000 t	77.5 bedef
7	Sin mucílago	4 000 t	62.5 cdefg
8	Sin mucílago	3 000 t	57.5 defgh
9	Con mucílago	3 000 t	50.0 fghi
10	Sin cutícula	1 500 t	47.5 ghij
11	Sin mucílago	1 500 t	42.5 ghijk
12	Sin cutícula	4 000 t	40.0 ghijkl
13	Sin cutícula	3 000 e	40.0 ghijklm
14	Sin mucílago	6 000 e	40.0 ghijklmn
15	Con mucílago	4 000 t	17.5 klmnñ
16	Con mucílago	1 500 t	12.5 klmnño
17	Con mucílago	300 t	0
18	Sin cutícula	300 t	0
19	Sin cutícula	300 e	0
20	Sin cutícula	300 t	0 X = 38.5
21	Con mucílago	6 000 t	0 C.V. = 17.2%

\* e = Estéril e = Clorotalonil t = thiram

En lo que se refiere a los diferentes tipos de PEG utilizado, hubo diferencias notables entre los pesos moleculares de 300 y 1500, con respecto a los de 3 000, 4 000 y 6 000 pero no entre éstos. La explicación de ello puede encontrarse en función de la presión osmótica ejercida, la cual, para una concentración dada, es mayor cuando aumenta el peso molecular.

La almendra sin cutícula, se conserva mejor que cuando ésta no se desprende (Cuadro 3). Esto quizás se debe a que la película protectora delgada de PEG que se forma sobre la semilla. Como lo interpretan Mumford y Brett (5), esa película permite solamente un mínimo intercambio de oxígeno y mantiene la presión osmótica adecuada para lograr un balance de agua entre absorción y deshidratación de la semilla; esto no ocurre de la misma forma en la almendra con mucílago. Probablemente, aunque permeable, la cutícula representa una barrera más que interfiere en el intercambio gaseoso y disminuye la acción osmótica del PEG.

Los resultados medios de la germinación, en el ensayo de conservación de la semilla de cacao en presencia de partes del fruto de cacao y de carbón vegetal en bolsas de polietileno, se presentan en el Cuadro 4. Puede observarse que el carbón vegetal resultó ser el mejor tratamiento para conservar las semillas en estas condiciones, superando aún al testigo cascabillo de café + thiram, sin mucílago. El carbón vegetal, como conservante, presenta la propiedad de absorción de ciertas sustancias líquidas o gaseosas, como agua y oxígeno. Posiblemente, esto explique que dicho conservante haya permitido conservar mejor la viabilidad de las semillas.

Ningún tratamiento de esta serie fue capaz de conservar la viabilidad de las almendras de todo el lote por un mes, aún cuando se usó fungicida para el control de hongos. La incorporación de polietilén glicol en solución acuosa a lotes de 100 almendras en bolsas de polietileno, no dio buenos resultados, según los experimentos en caja de Petri (0% de germinación). Es posible que, al conservar cantidades mayores de 10 almendras en solución acuosa de PEG, la acción osmótica de éste persista, pero, el intercambio gaseoso se dificulta en el centro del lote almacenado y por lo tanto, las semillas mueren por asfixia. Este hecho se comprobó, en cierta forma, al repetir el experimento de caja de Petri + PEG - 3 000 - thiram, pero, invirtiendo la posición de la caja de Petri (con la tapa hacia abajo). En este caso, se obtuvo 0% de germinación seguramente porque la posición de la caja y de la solución sobre las almendras dificultó el intercambio gaseoso.

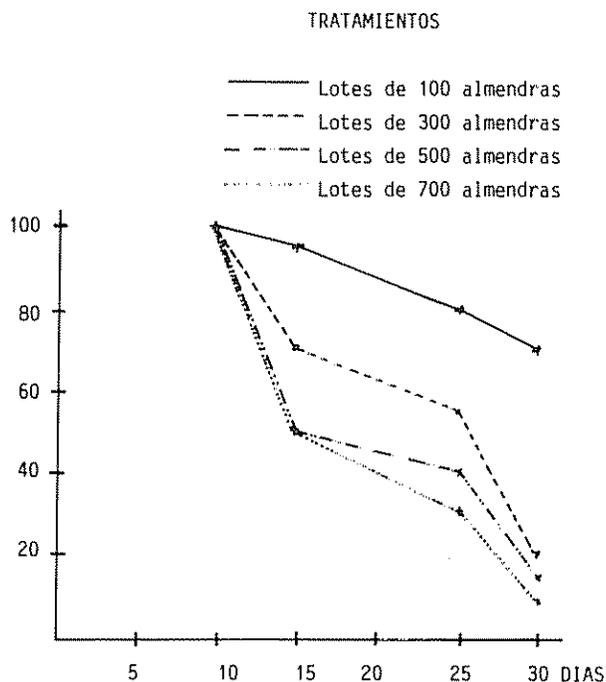


Fig 1 Efecto de la cantidad de almendras de cacao *Theobroma cacao* L., sobre su germinación, al conservarlas en carbón vegetal, en bolsa de polietileno.

Al usar trozos de mazorca y jugo de mucílago no se obtuvieron buenos resultados; es probable que estos elementos, que en el fruto sano funcionan como inhibidores de la germinación, sean eficaces aún en presencia de aire; sin embargo, la semilla no es capaz de soportar por largos períodos esta inhibición sin realizar actividades metabólicas adversas (5).

En la Fig 1 se muestra la evaluación media de la pérdida de poder germinativo de lotes de diferentes cantidades de almendras de cacao, tratadas con carbón vegetal por un mes. En ella se observa que es posible conservar, durante 10 días, el 100% de germinación aún en lotes de 700 almendras; sin embargo, a partir de un tiempo de almacenamiento, la viabilidad

Cuadro 2. Efecto del fungicida y del polietilén glicol sobre la germinación de semillas de cacao sin cutícula (datos transformados por Arc Sen %).

Fuente de variación	PEG				$\bar{X}$
	3 000	4 000	6 000		
Thiram	71.6	67.5	65.7	67.5	DSM 8.5 al 5%
Clorotalonil	39.6	39.2	39.1	39.1	
$\bar{X}$ PEG	55.4	53.3	42.4		
	DSM 5.45 al 5%				

disminuyó en todos los lotes y la pérdida de la misma es más rápida a medida que aumenta la cantidad de almendras en el lote. Así, mientras que en un lote de 700 almendras, al cabo de un mes de almacenamiento, se conserva viable el 6% de las almendras, en bolsas con 100 se puede conservar el 70%. El aumento del contenido de oxígeno en la atmósfera circundante, en muchos casos, estimula la germinación de la semilla intacta; en este caso, al aumentar el volumen de almendras almacenadas se disminuye el contacto de éstas con el oxígeno y por lo tanto, se limita la respiración en el centro del lote. Por otra parte, la semilla, al continuar respirando, agotará el oxígeno disponible, desprenderá bióxido de carbono y calor, lo cual es un factor limitante de la viabilidad de la semilla.

CONCLUSIONES

1. El almacenamiento de almendras de cacao, en caja de Petri, a temperatura ambiente, conserva un 97.5% de germinación al utilizarlas sin cutícula, en presencia de thiram y de polietilén glicol 3 000, después de un mes. En bolsa de polietileno, este efecto no persistió.
2. El carbón vegetal permite mantener el 71.75% de la germinación de lotes de 100 almendras, en bolsa de polietileno, durante un mes de almacenamiento, a temperatura ambiente.
3. Aparentemente, el almacenamiento de almendras viables de cacao está fuertemente supeditado a un intercambio mínimo gaseoso, por lo que lotes mayores de 100 almendras, en presencia de carbón vegetal, pierden pronto su viabilidad.
4. El uso de trozos de mazorca y jugo de mucílago como conservantes, no es adecuado para prolongar el período de almacenamiento de las almendras de cacao.

Cuadro 3. Efecto del polietilén glicol y las condiciones de la semilla de cacao sobre su germinación (datos transformados por Arc Sen %).

Condiciones de la semilla	Peso molecular PEG					$\bar{X}$
	300	1 500	3 000	4 000	6 000	
Sin cutícula	0	43.5	71.6	67.5	65.7	49.6
Con mucílago	0	40.6	45	24.5	0	22
	DSM 9.4 al 5%					
$\bar{X}$	0	42	58.3	48	38.8	
	DSM 3.8 al 5%					

Cuadro 4. Porcentaje de germinación de semillas de cacao, en presencia de partes del fruto o carbón vegetal, a un mes de almacenamiento, en bolsas de polietileno.

1. Sin mucílago, carbón vegetal	71 75 a
2. Sin mucílago, thiram-cascabillo (T)	41 87 b
3. Sin mucílago, trozos de mazorca-cascabillo	5 67 c
4. Sin mucílago, trozos de mazorca-clorotalonil cascabillo	3 75 cd
5. Sin mucílago, trozos mazorca-clorotalonil cascabillo	3 3 d
6. Jugo de mucílago -- cascabillo	0 e
7. Jugo de mucílago -- clorotalonil - cascabillo	0 e
8. Sin mucílago, PEG 3 000 thiram - cascabillo	0 e
9. Sin cutícula, PEG 3 000 thiram	0 e
C.V. = 16%	

## LITERATURA CITADA

1. EVANS, H. 1950. Results of some experiments on the preservation of cacao seed in viable condition *Tropical Agriculture* 27:48-55.
2. FORSYTH, W.G.; QUESNEL, V.C. 1958. Studies on cocoa curing 1956-1958 Palmira, Col. p 181.
3. HOLDEN, M. 1961. Biochemical changes in cocoa fermentation *Brit Food: Research Association Science and Technology Surveys* 38:31-40
4. KING, M.W.; ROBERTS, E.H. 1982. *Seed Science and Technology* 10:535-540.
5. MUMFORD, P.M.; BRETTI, A.C. 1982. Conservation of cacao seed. *Tropical Agriculture* 59(4):306-310.
6. SANCHEZ VAZQUEZ, J.; JIMENEZ, F. 1985. Almacenamiento de semillas de cacao para siembra. Informe Anual de Actividades México, SARH - INIFAP - CERI