



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

ANATOMÍA Y TOLERANCIA A LA DESECACIÓN DE
SEMILLAS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.)

MARÍA ALMA RANGEL FAJARDO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO.

2009

La presente tesis titulada: **Anatomía y tolerancia a la desecación de semillas de cacao** (*Theobroma cacao* L.), realizada por la alumna: **María Alma Rangel Fajardo**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
DR. LEOBIGILDÓ CÓRDOVA TÉLLEZ

ASESORA: 
DRA. ADRIANA DELGADO ALVARADO

ASESORA: 
DRA. HILDA ARACELI ZAVALA MANCERA

ASESOR: 
DR. ÁNGEL VILLEGAS MONTER

ASESOR: 
DR. IGNACIO VIDALES FERNÁNDEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, noviembre de 2009

ANATOMÍA Y TOLERANCIA A LA DESECACIÓN DE SEMILLAS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.)

*Maria Alma Rangel Fajardo, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2009.*

La adquisición de tolerancia a la desecación en semillas ortodoxas es una estrategia adaptativa que no presentan las semillas del tipo recalcitrantes y por consiguiente son sensibles a la desecación. El grado de tolerancia o sensibilidad a la desecación se ve afectada por varios aspectos de origen genético, fisiológico, bioquímico y anatómico; por consiguiente existen diferencias entre genotipos y entre individuos dentro del genotipo de la misma especie. En este estudio se documentaron características de anatomía de las semillas de cacao, se midió el grado de tolerancia a la desecación y la acumulación de azúcares en relación con tolerancia a la desecación en poblaciones de tres orígenes genéticos de cacao (*Theobroma cacao* L.). Se emplearon los genotipos UF667 y UF668 de origen Trinitario, EET 48 y Pound 7 de origen Forastero y Carmelo de origen Criollo. El trabajo consistió de tres fases: 1) Documentación de anatomía de desarrollo de la semilla. Se usaron flores y frutos en desarrollo del genotipo Carmelo obteniendo cortes seriados (10 a 15 μm) para ser teñidos con safranina y verde fijo. En semilla madura se realizaron tinciones para observar lípidos, proteínas, almidón y taninos. 2) Tolerancia a la desecación. Se cosecharon semillas a los 5, 6 y 7 meses después de floración (mdf) de los cinco genotipos, en las que se midió largo, ancho, espesor y contenido de humedad; parte de la muestra se sometió a secado bajo condiciones de laboratorio hasta 300, 200 y 150 $\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ pf, manteniendo como testigo semilla con contenido de agua al momento de cosecha ($>500 \text{ g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ pf); en estas se midió germinación y viabilidad celular por medio del conteos de núcleos visibles en cortes del eje embrionario. 3) Cuantificación de azúcares y su relación con la tolerancia a la desecación. Se utilizaron únicamente muestras de los genotipos UF668, Pound 7 y Carmelo, con contenidos de humedad al momento de cosecha y a 300 $\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ pf y como referencia se utilizó semillas de maíz (ortodoxa) a 300 $\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ pf, la cuantificación de carbohidratos fue por HPLC. Los resultados indican que la semilla de cacao proviene de un óvulo anátropo crasinucelar, el embrión presenta crecimiento lento inicial, el endospermo tiene un desarrollo nuclear hasta que la semilla alcanza el tamaño final, los cotiledones se encuentran fuertemente plegados sobre el eje embrionario y la cubierta seminal presenta células de lumen grande y paredes delgadas y células largas de paredes delgadas en la parte exterior de la testa, característica que se relaciona con hidrocoria y mixospermia. Los cinco genotipos difieren en tolerancia a la desecación a 300 $\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ pf, nivel en que UF668 y EET 48 mantienen germinación superior a 50 %, mientras que Carmelo presenta 0 %; sin embargo, ningún genotipo toleró secado a 200 y 150 $\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ pf; la máxima viabilidad celular se obtuvo en los genotipos más tolerantes al secado. Las concentraciones de oligosacáridos mostraron diferencias entre materiales, fechas de cosecha, secado y tejido; sin embargo, la mayor relación de rafinosaa:sucrose en todos los factores coincidió con los porcentajes de germinación más altos. Por lo anterior se concluye que las semillas de cacao presentan características anatómicas distintivas de especies recalcitrantes. Existen diferencias entre genotipos al grado de desecación a 300 $\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ pf pero a 200 $\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ la muerte es inminente. Las acumulaciones de oligosacáridos y las proporciones de estos no son suficientes para tolerar reducciones de humedad de 200 $\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Palabras clave: *Theobroma cacao* L., anatomía, desecación, estaquiosa, germinación, rafinosa, semilla, sensibilidad.

ANATOMY AND DESICCATION TOLERANCE OF COCOA SEEDS (*Theobroma cacao* L.)

*Maria Alma Rangel Fajardo, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2009.*

Acquisition of desiccation tolerance in orthodox seed is an adaptive strategy that is absent in recalcitrant seeds and consequently they are desiccation sensitive. The degree of tolerance or sensitivity to desiccation depends upon genetic, physiological, biochemical and anatomical feature, leading to the differences in desiccation tolerance among genotypes and individuals within the genotype from the same species. In this study, some anatomical traits of cocoa seeds were documented and the degree of desiccation tolerance as well as its relationship with sugar accumulation was determined in populations of three genetic origins of cocoa seed (*Theobroma cacao* L). UF667 and UF668 genotypes from “Trinitario” origin, 48 EET and Pound 7 from “Forastero” origin and Carmelo from Landrace origin were used. The study had three phases: (1) Documentation of seed anatomy. Carmelo genotype was used, from which tissue samples from flowering to mature seed were obtained. Cuts of 10 to 15 μm were used to observe changes of seed anatomy during its development; in addition, in mature seed tissue-staining was made to observe lipids, proteins, starch and tannins. 2) Determination of desiccation tolerance. Seed samples from the five genotypes were harvested at 5, 6, and 7 months after flowering, in which seed length, width, thickness and moisture content were measured; a seed sample was subjected to drying under laboratory conditions until seed moisture reach 300, 200 and 150 $\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ fw, maintaining as a negative control seed with harvested moisture content (>500 $\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ fw); in these treatments germination and cellular viability (counting visible nuclei in embryonic axis cuts) were quantified. 3) Sugar accumulation and its relationship with desiccation tolerance. Seed samples of UF668, Pound 7 and Carmelo were used; all of them at harvested moisture content and at 300 $\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ fw; in addition, maize seed (ortodox) at 300 $\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ fw was used as a reference; carbohydrate quantification was measured with an HPLC analyzer. The results indicate that cacao seed comes from a crasinucellar anatropous ovule, that the development of the embryo is slow and resides submerged in a liquid gelatinous endosperm until the seed reaches the average size (2.5 cm); cotyledons are strongly folded on the embryonic axis and the seed coat is thin with the presence of cells containing a big lumen and thin walls, and elongated cells of thin walls can be observed in the outer layer of the seed coat which is related to hidrocoria and mixospermia. The five genotypes differed in desiccation tolerance at 300 $\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ fw, point at which UF668 and EET 48 retained their germination above 50 % whereas the germination of Carmelo reached 0%; however, none of the genotypes tolerate desiccation below 200 $\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ fw; the highest values of cellular viability were obtained in those genotypes less sensitive to desiccation. Oligosaccharide concentrations showed differences among genotypes, harvests, drying and tissue; nevertheless, the highest relation raffinose:sucrose for all these factors was related with the highest germination values. It is concluded that cocoa seed showed anatomical traits distinctive of recalcitrant species. There are differences among genotypes at 300 $\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ fw, but none of them survive at 200 $\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ fw. Oligosaccharide accumulation and their proportions are insufficient to tolerate dehydration at 200 $\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ fw.

Key words: *Theobroma cacao* L., anatomy, drying, germination, raffinose, seed sensitivity, stachyose.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por otorgarme una beca para realizar estudios de postgrado.

A Dios por darme la paciencia suficiente para concluir esta etapa.

A los miembros de mi consejo particular: Dr. Leobigildo Córdova Téllez, Dra. Adriana Delgado,
Dra. H. Araceli Mancera, Dr. Ángel Villegas y Dr.
Ignacio Vidales.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (**INIFAP**) Campo Experimental Huimanguillo, en especial al MC. P. Alejandro López por las facilidades prestadas durante la realización de este trabajo en aspectos logísticos, operativos y por la donación de material vegetal.

A las siguientes personas por sus orientaciones y apoyo durante todo el trabajo de laboratorio: Dr. Víctor González, Dra. Ana Bertha Cruz, Dra. Claudia Castañeda, Sr. Miguel Pérez y Sr. Juan Herrera.

A los profesores y personal de la Orientación Producción de semillas

A mis amigos y compañeros: Elvia Rosas, Aurea Liz Torres, Teresa Rivero, Eutiquio Soní, Claudia Castañeda, Ernesto Tapia, Isabel, Susy, Gabi, Juanito, Luz.

DEDICATORIA

Al Dr. Emiliano Loeza Kuk, por ser mi compañero incondicional, por brindarme la confianza y tiempo necesario, además de ser un esposo genial.

A mi inspiración y el mejor regalo que he recibido, gracias Emilia por estar ahí en el momento preciso.

A las Familias Rangel Fajardo y Loeza Kuk. Gracias

"Todo el que disfruta cree que lo que importa del árbol es el fruto, cuando en realidad es la semilla. He aquí la diferencia entre los que creen y los que disfrutan." (Friedrich Wilhelm Nietzsche)

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
III. ANATOMÍA E HISTOQUÍMICA DE <i>Theobroma cacao</i> L., CON ÉNFASIS EN SEMILLA MADURA.....	22
RESUMEN.....	22
ABSTRACT.....	23
INTRODUCCIÓN.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
RESULTADOS.....	26
DISCUSIÓN.....	31
IV. TOLERANCIA A LA DESECACIÓN DE LAS SEMILLAS DE CACAO (<i>Theobroma cacao</i> L.) DE TRES ORÍGENES GENÉTICOS.....	35
RESUMEN.....	35
ABSTRACT.....	36
INTRODUCCIÓN.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES.....	53
V ACUMULACIÓN DE AZÚCARES EN SEMILLAS DE CACAO (<i>Theobroma cacao</i> L.) DE TRES ORÍGENES GENÉTICOS Y SU RELACIÓN CON TOLERANCIA A LA DESECACIÓN.....	56
RESUMEN.....	56
ABSTRACT.....	57
INTRODUCCIÓN.....	58
MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
RESULTADOS	62
DISCUSIÓN.....	69
CONCLUSIONES.....	71
VI. DISCUSIÓN GENERAL.....	76

ÍNDICE DE CUADROS

Capítulo IV	TOLERANCIA A LA DESECACIÓN DE LAS SEMILLAS DE CACAO (<i>Theobroma cacao</i> L.) DE TRES ORÍGENES GENÉTICOS	
Cuadro 1.	Promedios de las variables evaluadas en las semillas de cacao, resultado de los factores principales de variación.	42
Cuadro 2.	Promedios de núcleos normales (viabilidad celular) en el meristemo radicular, cuerpo del eje embrionario y caliptra en semillas de cacao de tres genotipos para tres fuentes de variación.	48
Capítulo V	ACUMULACIÓN DE AZÚCARES EN SEMILLAS DE CACAO (<i>Theobroma cacao</i> L.) DE TRES ORÍGENES GENÉTICOS Y SU RELACIÓN CON TOLERANCIA A LA DESECACIÓN	
Cuadro 1.	Promedios de los azúcares evaluados en semillas de cacao, resultado de los principales factores de variación.	63
Cuadro 2.	Factores simples analizados para la variable germinación y proporciones de rafinosa:sacarosa en semillas de cacao.	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo II	REVISIÓN DE LITERATURA	
Figura 1.	Eventos ocurridos durante el desarrollo y germinación de semillas intolerantes a la desecación (recalcitrantes) y el posible control de estos procesos. (Farrant <i>et al.</i> , 1993)	12
Capítulo III	ANATOMÍA E HISTOQUÍMICA DE <i>Theobroma cacao</i> L., CON ÉNFASIS EN SEMILLA MADURA	
Figura 1.	Óvulo y desarrollo temprano de <i>Theobroma cacao</i> L. A) Corte transversal del ovario de una flor en antesis. B) Corte mediano de óvulo en antesis. C) Corte transmediano del óvulo en antesis. D) Semilla joven (1 cm de longitud) con embrión en estado globular. E) Corte mediano del ovario. po: pared del ovario, l: lóculos, o: óvulos. ti: tegumento interno, ca: calaza, un: nucela, te: tegumento externo, m: micrópilo, r: rafe s: sinérgidas, nc: núcleos centrales, em: embrión, en: endospermo, h: hilo.	27
Figura 2.	Cambios en el desarrollo del embrión en semillas de cacao de frutos de 21 a > 25 cm de longitud. A) Embrión suspendido en endospermo líquido dentro de la semilla. B), C) y D) Embrión en posición dorsiventral, cotiledones sin plegar, E) y F) Embrión con cotiledones comenzando a plegarse, G) Embrión con cotiledones plegados, H) Secuencia de desarrollo del embrión desde estado inmaduro hasta la semilla madura.	29
Figura 3.	Desarrollo de testa y análisis histoquímico en semillas de <i>Theobroma cacao</i> L. A: Testa de semilla inmadura (1 cm longitud de frutos de 18.0-20.9 cm longitud). B: Testa de semilla madura (fruto de >25 cm de longitud). C: Células de cotiledones con cuerpos de proteína. D) Almidón. E) Taninos. F) Taninos condensados en cotiledón. e: endospermo, ti: tegumento interno, me: mesotesta, ex: exotesta, c: cotiledón, id: idioblastos, cp: cuerpo de proteína, a: almidón, t: taninos.	30
Capítulo IV	TOLERANCIA A LA DESECACIÓN DE LAS SEMILLAS DE CACAO (<i>Theobroma cacao</i> L.) DE TRES ORÍGENES GENÉTICOS	
Figura 1.	Características físicas de cinco genotipos de cacao a los 5, 6 y 7 meses después de floración. A) Contenido de agua; B) Peso seco, C) Espesor y D) Ancho.	43
Figura 2.	Germinación de cinco genotipos de cacao. A) en tres fechas de cosecha., B) secados a diferentes contenidos de agua., C) promedio de germinación en semillas con diferentes contenidos de agua en tres fechas de cosechas.	47

Figura 3.	Porcentaje de núcleos en células de tres genotipos de cacao en tres zonas del eje embrionario. A) Núcleos en tres genotipos con diferentes contenidos de agua., B) Núcleos en tres zonas del eje embrionario a diferentes contenidos de agua. C) Núcleos en tres zonas del eje embrionario.	50
Figura 4.	Cortes de radículas de embriones de cacao en el meristemo de raíz del eje embrionario. A) contenido de agua inicial; B) C) y D) con 300, 200 y 150 g H₂O kg⁻¹ pf , respectivamente. n: núcleo; p: pared celular; e: espacio intercelular. Observa la reducción de núcleos presentes en semillas sometidas a secado (C y D).	51
Capítulo V	ACUMULACIÓN DE AZÚCARES EN SEMILLAS DE CACAO (<i>Theobroma cacao</i> L.) DE TRES ORÍGENES GENÉTICOS Y SU RELACIÓN CON TOLERANCIA A LA DESECACIÓN	
Figura 1.	Acumulación de A) estaquiosa, B) rafinosa, C) sacarosa y D) glucosa en semillas de cacao, resultante de la interacción cosecha por genotipo.	65
Figura 2.	Acumulación de A) estaquiosa, B) rafinosa, C) sacarosa y D) glucosa en semillas de cacao, resultante de la interacción cosecha por secado.	66
Figura 3.	Acumulación de A) estaquiosa, B) rafinosa, C) sacarosa y D) glucosa en semillas de cacao, resultante de la interacción genotipo por secado.	67

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo tropical de importancia económica mundial, por su uso en la industria chocolatera. La conservación *ex situ* de germoplasma ha promovido en colecciones de campo, en viveros, e *in situ* dentro de su hábitat natural. El resguardo en cuartos fríos por plazos >50 años resulta un reto importante debido a que esta se considera de tipo recalcitrante (Mumford y Brett, 1982).

Algunas características de la anatomía de las semillas recalcitrantes ayudan a evitar la pérdida de humedad y en consecuencia la viabilidad, un ejemplo de ello son las cubiertas duras que actúan como barreras para prevenir la deshidratación (Moreno *et al.*, 2006) y en ocasiones éstas características evitan la imbibición e intercambio gaseoso (Farnsworth, 2000). El grosor de las cubiertas está directamente relacionado con el nivel de desecación, por lo que semillas recalcitrantes con cubiertas delgadas se deshidratan con mayor rapidez (Chacón y Bustamente, 2001). El tipo de endospermo también juega un papel importante en la protección de la viabilidad ya que en algunas semillas recalcitrantes es líquido-gelatinoso y conserva altos niveles de agua dentro de la (Alemano *et al.*, 1997; Sossou *et al.*, 2002)

Estas características aunadas a aspectos bioquímicos como la presencia de rafinosa y estaquiosa, proteínas LEA's (Late Embriogenesis Abundant, por sus siglas en inglés), cambios ultracelulares, entre otros, confieren a las semillas ortodoxas la capacidad de tolerar fuertes pérdidas de agua sin reducciones considerables de viabilidad. A diferencia de las semillas ortodoxas, las recalcitrantes, como las de cacao, no presentan la fase de deshidratación durante la etapa de maduración; asimismo, no presentan latencia, ya que germinan inmediatamente si las condiciones ambientales son favorables. Si la germinación no ocurre, la viabilidad postcosecha

de estas semillas es corta, lo cual resulta desventajoso en la conservación del germoplasma, aún por periodos cortos (Mumford y Brett, 1982; Pence, 1991; Fang *et al.*, 2003).

Para prolongar la viabilidad de las semillas recalcitrantes por días o semanas se recomienda mantenerlas con niveles altos de agua, pero inferiores a los requeridos para que ocurra la germinación (Barton, 1965). Are (1964) señala que semillas de cacao removidas del fruto y conservadas en medios como aserrín o carbón extienden su longevidad de 10 a 20 días y por tres meses si se colocan en bolsas de polietileno con fungicida. Algunas de estas semillas se han mantenido vivas por periodos de hasta 8 meses pero la germinación se ve reducida drásticamente a niveles inaceptables y los mecanismos que prolongan esa viabilidad no han sido determinados (King y Roberts, 1979).

En el caso de la conservación por periodos prolongados de material genético de cacao se ha empleado el cultivo *in vitro* de meristemas; sin embargo, es poco práctico por la demanda de trabajo y los altos costos de reactivos, además del riesgo de variación somaclonal (Fang *et al.*, 2003). Otra técnica utilizada es la crioconservación de explantes y embriones somáticos (Pence, 1991; Fang *et al.*, 2003), desafortunadamente son escasos los protocolos disponibles para esta especie en particular. Algunas de las dificultades en la implementación de esta técnica en cacao son la sensibilidad a la desecación y el tamaño de semilla que dificulta su manejo (Pence, 1991; Fang *et al.*, 2003). En el presente trabajo se analizó la estructura y algunos aspectos de la composición de la semilla de *Theobroma cacao* L. en estado inmaduro y maduro, se determinó los niveles de recalcitrancia de tres orígenes genéticos y la relación de la presencia de azúcares con el nivel de recalcitrancia. Esta información ayuda a comprender los mecanismos involucrados en la recalcitrancia de las semillas y proporciona elementos a considerar en el desarrollo de protocolos de conservación de germoplasma de *ex situ*.

II. REVISION DE LITERATURA

Distribución y dispersión del cacao

El género *Theobroma* es típicamente tropical y se distribuye en forma natural en los estratos medios de la selva cálida húmeda del hemisferio occidental, entre las latitudes de los 18° N (Veracruz, Tabasco; México) y los 15° S (Brasil y Bolivia), y en altitudes desde los 0 a los 1,000 m. La mayor parte de las especies del género *Theobroma* tienen distribución geográfica restringida, excepto las *Theobroma cacao* y *Theobroma bicolor* (López *et al.*, 2003).

La mayoría de las especies se concentran en América del Sur, de ahí el consenso de que el género se originó en esa región y probablemente en la Cuenca del Río Amazonas. Las especies del oriente de Brasil son diferentes a las demás especies, algunas de ellas se contraponen a las del otro lado de la Cordillera de los Andes; lo cual sugiere que la Cordillera pudo constituirse en una barrera natural que separó a las poblaciones geográficamente (López *et al.*, 2003).

Descripción de *Theobroma cacao* L.

Son árboles que alcanzan de 4 a 15 m de alturas, con hábito de crecimiento dimórfico, con brotes ortotrópicos o chupones. Las hojas son enteras de 15 a 50 cm de longitud y de 4 a 15 cm de ancho, con ápice agudo o subagudo, la lámina es subobovada u oblongo elíptica y están unidas a pecíolos provistos en su base de 2 estípulas gruesas en el vértice de 2.5 cm aproximadamente y cubiertos de tricomas rojizos, poco visible (Wood, 1982).

Flores. Las inflorescencias se localizan en el tallo, ramas principales (truncadas y caulífloras), en la base de las hojas, alrededor de la yema axilar y en la cicatriz que deja a la caída de la hoja. El número de flores varía de acuerdo al genotipo y al sistema de cultivo. La aparición de flores es durante todo el año, pero particularmente en los solsticios, la mayor parte abortan, las que quedan

son las que producen frutos (Wood, 1982; Nosti, 1953). La flor es pequeña de 1 a 1.5 cm de diámetro y completa, ovario súpero con 5 carpelos (Wood, 1982).

Fruto. Es una baya conocida comúnmente como “mazorca”. Las semillas están dispuestas en placentación axial e incrustadas en una masa mucilaginoso. La forma del fruto varía de globosa a fusiforme, con una constricción en el extremo del pedúnculo y el ápice es generalmente agudo. La superficie presenta 10 lomos, cinco de los cuales son más elevados que el resto (Wood, 1982). Los frutos maduran y pueden cosecharse a los 5 ó 7 meses después de floración (López *et al.*, 2003; Wood, 1982).

Semilla. La semilla de cacao se conoce también como “haba”, “grano” o “ almendra”, se localiza dentro de la túnica del fruto, y el número varía de 30 a 40, puede llegar hasta 70; la forma es aplanada, ovoide, de 2 a 3 cm de longitud, 1.5 cm de ancho y con una fina testa. Tanto la testa como la almendra son de color pardo rojizo que varía en diversas variedades comerciales (Wood, 1982; Nosti, 1953). La germinación es epígea. Las semillas, una vez retiradas del fruto, germinan rápidamente, a los 4 ó 6 días después de la siembra (DDS).

Clasificación

Las poblaciones y clones derivados de cacao se pueden clasificar en tres grandes grupos: criollos, forasteros y trinitarios (López *et al.*, 2003).

“*Cacao criollo*”. Dentro de este grupo se ubican las formas de *Theobroma cacao* subespecie *cacao*, que crecen espontáneamente en el Sureste de México y Centroamérica; se consideran los primeros domesticados en las regiones cálido-húmedas, donde se ubicaron asentamientos de la cultura Mesoamericana.

Este grupo se caracteriza por sus frutos angostos y alargados, con punta pronunciada; la coloración varía según el estado de desarrollo, puede ser de color verde, verde blanquizo en estado inmaduro, y amarillo a rojizo cuando maduran. No obstante, su principal característica es la pigmentación de los cotiledones de la semilla, de color blanco en los granos frescos. Presentan características de tener alto contenido de grasas, sabor y aroma; sin embargo, actualmente el germoplasma ha perdido su importancia comercial y está en declinación debido a los bajos rendimientos y alta susceptibilidad a enfermedades, sustituyéndose así, por cacaos forasteros. No obstante, se recomienda implementar acciones tendientes al rescate y conservación de estos materiales por su alto valor histórico y genético. En la actualidad, este germoplasma se conserva en colecciones de campo en el INIFAP en Tabasco y Chiapas (López et al., 2003).

“*Cacao forastero*”. Este grupo de materiales corresponde a *Theobroma cacao* subespecie *sphaerocarpum*, cuyo genotipo característico es el denominado calabacillo, que integra poblaciones homogéneas en la Cuenca del Río Amazonas, cuyas características morfológicas y distribución geográfica se consideran opuestas a los tipos criollos y cacaos cultivados. El fruto es de forma ovalada y corta, de color verde o amarilla cuando maduro, con una superficie lisa. Pericarpio espeso y difícil de cortar a causa de mesocarpio fuertemente lignificado; granos pequeños y más o menos aplastados y tienen color entre púrpura claro y oscuro. Este tipo forma un grupo complejo tanto en sus formas silvestres como cultivadas. Dada su alta producción, el tipo forastero domina la producción mundial. Estos cacaos se consideran de domesticación relativamente reciente, en comparación a los criollos, ya que al parecer en Brasil se comenzaron a cultivar a partir de 1740 (López et al., 2003).

“*Cacao trinitario*”. Existen evidencias que demuestran que es de origen reciente y pueden reproducirse artificialmente. Se cree que ésta es una población segregante, originada por el

cruzamiento entre cacaos forasteros de Guyana y los criollos de Venezuela, ocurrido probablemente en el estuario del Río Orinoco y más tarde una generación temprana de la cruce se introdujo en la Isla de Trinidad. En la actualidad, estas poblaciones presentan gran variabilidad y pueden encontrarse mezcladas en ellas, formas de cacao criollo forastero (calabacillo) y varios tipos intermedios (López et al., 2003).

Fisiología y bioquímica de las semillas recalcitrantes

Diversos mecanismos se han asociado a la tolerancia a la desecación de las semillas, entre los que Leprince *et al.* (1993) señalan los siguientes:

1. Características físicas intracelulares
 - a) Reducción de la vacuola
 - b) Acumulación y naturaleza de las reservas insolubles
 - c) Reacción del citoesqueleto
 - d) Conformación del ADN, la cromatina y la arquitectura nuclear.
2. Reducción de la superficie de las membranas y probablemente del citoesqueleto.
3. Presencia y eficiencia en la operación de los sistemas antioxidantes
4. Acumulación de moléculas de protección, LEA (“late embryogenesis abundant”), sacarosa y oligosacáridos.
5. Despliegue de ciertas moléculas anfipáticas
6. Una efectiva capa de oleosinas rodeando a los cuerpos lípidos
7. La operación de mecanismos de reparación durante la rehidratación

Aunque se ha encontrado la presencia de algunos de estos mecanismos en las semillas recalcitrantes, se señala que la ausencia o la expresión inefectiva de uno o más de estos procesos pueden determinar la sensibilidad a la desecación en éstas (Farrant *et al.*, 1993.)

La variación en la tolerancia a la deshidratación de la semilla puede ser atribuida a características propias de la planta y condiciones ambientales. Dentro de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos que se han implicado de la sensibilidad a la deshidratación en semillas recalcitrantes se pueden enumerar los siguientes:

Azúcares y soluciones compatibles: En semillas ortodoxas, Blackman *et al.* (1992) sugieren que la acumulación de algunos azúcares y otras soluciones compatibles, así como la proporción presente de estos, está involucrada en la tolerancia a la desecación. Disacáridos (trealosa y sacarosa) y oligosacáridos (rafinosa) están relacionados en la estabilización de membranas durante la deshidratación (Buitink *et al.*, 2000), mientras que en las semillas recalcitrantes se ha sugerido que muestra dependencia a la deshidratación debido a la baja acumulación de algunos oligosacáridos (Blackman *et al.*, 1992) o la proporción de estos en los tejidos de la semilla, particularmente el eje embrionario (Kermode y Finch-Savage, 2002).

En cuantificaciones directas no se ha corroborado que exista una proporción menor de oligosacáridos en recalcitrantes que en ortodoxas (Farnsworth, 2000). Farrant *et al.* (1993) confirman que los niveles de rafinosa en los ejes embrionarios de semillas recalcitrantes pueden ser iguales o exceder a los presentes en las ortodoxas; por otro lado, Vertucci y Farrant (1995) indican que el remplazo de agua en las membranas y la vitrificación del citoplasma está presente también en las semillas recalcitrantes. En este sentido se han realizado intervenciones donde se sugiere que no solo los niveles de oligosacáridos están involucrados en la vitrificación sino también las proteínas denominadas LEA's (Late Embriogenesis Abundant). Su expresión se ha detectado en muchas familias vegetales sometidas a diferentes tipos de estrés, como el hídrico, congelamiento y aclimatación a frío y salinidad (Close, 1996, Ismail *et al.*, 1999; Rizhsky *et al.*, 2002; Caruso *et al.*, 2002; Soulages *et al.*, 2003).

La acumulación de dehidrinas es un cambio bioquímico que ocurre en la etapa tardía del desarrollo de semillas ortodoxas (Dure *et al.*, 1989; Close, 1996). Las dehidrinas se localizan en el núcleo, citoplasma y membrana plasmática y están enlazadas a lípidos de la membrana en mitocondrias, vacuolas y cloroplastos (Colmenero *et al.*, 1999; Close, 1996; Soulages *et al.*, 2003, Lin y Tomashow, 1992). Entre las funciones atribuidas a las dehidrinas, están: 1) estabilizar y proteger membranas durante la desecación de las semillas (Close, 1996); 2) proveer una capa de residuos hidroxilados para interactuar con otras proteínas, y reemplazar a moléculas de agua (Cuming, 1999); y 3) regular el potencial osmótico al funcionar como atraparoras de agua en células en condiciones de alta osmolaridad (Nylander *et al.*, 2001).

El estrés oxidativo es otro factor que influye en la sensibilidad a la deshidratación (Kermode y Finch-Savage, 2002; Dussert *et al.*, 2000) Los sistemas antioxidantes de la ruta del ácido ascórbico-glutatión son importantes durante el desarrollo y germinación de las ortodoxas, eliminando los radicales libres generados en estos procesos (Vertucci y Farrant, 1995). Tommasi *et al.* (1999) señalan que las semillas recalcitrantes presentan mayor contenido de ácido ascórbico y actividad enzimática de la ruta, por lo que durante la diseminación de estas, los radicales libres son controlados por el metabolismo de la semilla; sin embargo, la deshidratación hace ineficientes estos sistemas.

La disminución en las actividades de las enzimas antioxidantes está directamente asociada a la pérdida de viabilidad (Hendry *et al.*, 1992) y el ácido ascórbico por si solo no puede prevenir o retrasar el daño oxidativo inducido por la deshidratación, teniendo por resultado la peroxidación de las membranas seguido de la desintegración y muerte celular (Hendry *et al.*, 1992; Leprince *et al.*, 1999), tal como fue observado en semillas recalcitrantes de té (*Camellia sinensis* L. Kuntze), cacao y *Quercus rubra* (Changrun y Sun, 1999; Sun, 1999).

Sensibilidad de las semillas a la desecación

Las semillas botánicas se han agrupado en ortodoxas (tolerantes a desecación) y recalcitrantes (sensibles a desecación) (Roberts, 1973). En general, las semillas ortodoxas pueden perder hasta 95 % de agua, lo cual les permite entrar en quiescencia por largos periodos sin sufrir daños en sus organelos y pérdida de viabilidad (Karssen, 1995). También permite a estas semillas ser almacenadas a bajas temperaturas y humedad relativa, condiciones que les ayudan a mantener la viabilidad por periodos prolongados (Roberts, 1973). En contraste, la viabilidad de las semillas recalcitrantes se abate considerablemente cuando el contenido de agua se reduce por abajo del 30 % (Greggains *et al.*, 2000). Estas semillas no pueden ser almacenadas por períodos largos y son susceptibles a las bajas temperaturas en el almacén (Roberts, 1973). En general, la mayoría de los cultivos agrícolas de clima templado pertenecen al grupo de semillas ortodoxas mientras que las recalcitrantes son, principalmente, de origen tropical y templado húmedo (Farrant *et al.*, 1996). Los avances en investigación de los últimos 15 años han permitido proponer la existencia de un tercer grupo denominado “intermedio”. Este grupo combina características de las recalcitrantes y ortodoxas. Las semillas intermedias pueden perder cantidad intermedia de agua sin reducir la viabilidad, pero muchas mueren al secarse por completo. Estas semillas también sufren más daños durante el almacenamiento que las semillas ortodoxas (Kermode, 1997; Leprince *et al.*, 1993).

La principal diferencia entre las semillas ortodoxas y recalcitrantes estriba en la respuesta fisiológica a la deshidratación. Con base en tal característica, Hanson (1984) sugiere que sería más acertado y significativo designar a las semillas ortodoxas como "tolerantes a la deshidratación, y a las recalcitrantes como "susceptibles a la deshidratación". Además de lo anterior, la mayoría de las semillas recalcitrantes son susceptibles a bajas temperaturas (King y

Roberts, 1979), siendo frecuente que ni siquiera toleren temperaturas próximas al punto de congelación, como en el caso de las semillas de *Hevea brasiliensis* y *Nephelium lappaceum* o de *Theobroma cacao*, las cuales pueden sufrir daño incluso a temperaturas próximas a los 15 °C (Chin, 1975).

Roberts *et al.* (1973) propusieron que las especies que producen semillas recalcitrantes pueden agruparse en dos tipos: a) especies provenientes de hábitats acuáticos y b) especies arbóreas que producen semillas de tamaño grande. Este último grupo comprende muchos cultivares tropicales importantes tales como: árbol del hule, coca y coco; varias especies frutícolas como: mango, mangostán, durián, rambután y jackfruit o jaka, algunas especies productoras de madera pertenecientes a las familias *Dipterocarpaceae* y *Araucareaceae*; así como algunas especies originarias de zonas templadas como encinos y castañas. En general los pesos y volúmenes medios de las semillas recalcitrantes son mayores que los correspondientes a las semillas ortodoxas.

La recalcitrancia de las semillas es frecuente tanto en angiospermas como en gimnospermas. Los árboles que producen semillas recalcitrantes se restringe típicamente a ambientes tropicales acuáticos y semiacuáticos (Tweddle *et al.*, 2003) donde la germinación y establecimiento de las plántulas puede ocurrir en cualquier época del año (Kainer *et al.*, 1999), condiciones que favorecen menores requerimientos de latencia en comparación con las semillas ortodoxas.

Desarrollo de las semillas recalcitrantes

La fisiología de las semillas recalcitrantes presenta el mismo patrón que las semillas ortodoxas hasta antes de la maduración-secado y diseminación (Figura 1). En general las semillas recalcitrantes se dispersan cuando aun no han perdido agua o bien pueden mantenerse unidas a la planta madre y seguir acumulando peso seco y continuar con su metabolismo activo, conservan la

sensibilidad a la desecación y no requieren de un estímulo de desecación para la subsiguiente germinación (Black y Pritchard, 2000). En el caso de las ortodoxas, la habilidad de tolerar fuertes reducciones de humedad se incrementa a través de la acumulación de reservas y conforme el contenido de humedad disminuye; sin embargo, esto no ocurre en el caso de las semillas recalcitrantes (Vertucci y Farrant, 1995). Existen varias interrogantes sobre este grupo de semillas, como ¿por qué pierden la viabilidad conforme se van deshidratando? o ¿por qué existe gran variación en cuanto a la sensibilidad a la desecación? (Black y Pritchard, 2000).

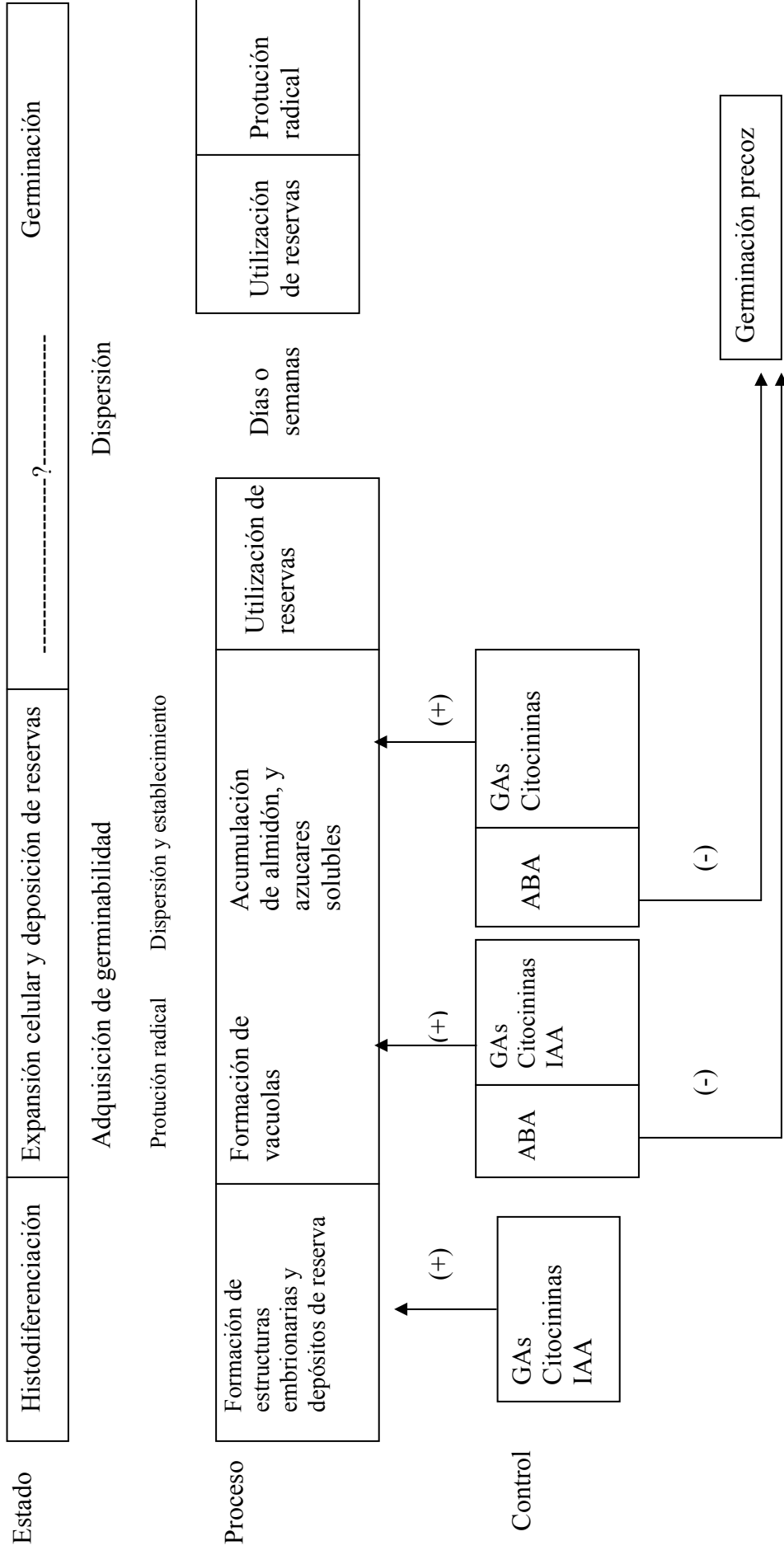


Figura 1. Eventos ocurridos durante el desarrollo y germinación de semillas intolerantes a la desecación (recalcitrantes) y el posible control de estos procesos (Farrant *et al.*, 1993).

El grado de sensibilidad de las semillas recalcitrantes a la deshidratación varía entre especies. Por ejemplo, las semillas del "Alcanfor de Borneo" (*Dryobalanops aromatica*) son dañadas cuando el contenido de agua se aproxima al 35 % (Chin, 1978); las del cacao (*Theobroma cacao*) sufren daño es ligeramente inferior al 27 %; mientras que las de rambután (*Nephelium lappaceum*) incluso cuando está por debajo del 20 % (Chin, 1975). El contenido crítico de agua, en el cual todas las semillas morirían, varía entre 12 y 31 % (Roberts, 1973).

De acuerdo con Roberts (1973) la razón por la cual la deshidratación puede causar la muerte de las semillas recalcitrantes aún no está del todo clara. King y Roberts (1979) han sugerido las dos siguientes explicaciones: a) La muerte de las semillas recalcitrantes ocurre rápidamente en o por debajo de su contenido crítico de agua (hipótesis del contenido crítico de agua); o b) La pérdida de viabilidad ocurre en un amplio rango que se encuentra negativamente correlacionado con el contenido de agua de las semillas (hipótesis del contenido no crítico de agua).

En adición a esas teorías, algunos investigadores opinan que también las membranas celulares pueden perder su integridad, llegando a la desintegración del núcleo, tal como se ha observado en células de semillas del árbol del hule durante el proceso de secado al sol (Chin, 1978). Las semillas de muchas plantas tropicales contienen altas concentraciones de compuestos fenólicos, así como de oxidasas fenólicas, compuestos que en condiciones normales se encuentran en el interior de las células; pero que durante la deshidratación al ser dañadas las membranas celulares, quedan en libertad y al ser oxidados pasan a formar moléculas protéico-fenólicas que en última instancia restringen la actividad enzimática (Loomis y Battaile, 1966).

Las semillas recalcitrantes poseen otras características. Por ejemplo, el embrión de las semillas del rambután es pequeño y se encuentra ubicado en diferentes posiciones entre los dos cotiledones, que pueden ser de diferente tamaño (Chin, 1975). Las semillas de otras especies

como las del mango (*Mangifera indica* L.), son poliembriónicas. En este sentido, es importante conocer la estructura básica de las semillas si realmente se quiere interpretar correctamente los resultados de los estudios pertinentes a su fisiología.

Dado que los frutos de las especies que presentan semillas recalcitrantes son altamente perecederos, éstos son frecuentemente desprendidos de la planta madre con grados heterogéneos de maduración y altos contenidos de agua. Una limitante más de las semillas recalcitrantes se deriva de su tamaño relativamente grande, que dificulta su conservación (Cuevas, 2004).

Conservación

La forma tradicional de conservar el material genético de estas especies es principalmente en viveros, colecciones de campo y huertos; sin embargo, esta forma de conservación ha tenido algunos problemas, debido a que se ve amenazado por condiciones ambientales adversas, así como la presencia de plagas y enfermedades que pueden poner en riesgo algunos materiales susceptibles (López *et al.*, 2003). Algunos investigadores han dirigido sus esfuerzos en la conservación de semillas; Are (1964) reportó que dentro de las cubiertas de los frutos se mantuvieron viables por dos semanas, mientras que semillas extraídas de frutos y conservadas en carbón o aserrín o bien solo tratadas con fungicida y en bolsas de polietileno se mantenían viables hasta por tres meses.

En otros estudios han investigado métodos de almacenamiento para mantener las semillas viables fuera de la mazorca. La mejor respuesta de almacenamiento registrada es: 24 % de viabilidad después de 8 meses almacenando las semillas a 20 °C y 98 % de humedad relativa (40.6 % de contenido de humedad) con la aplicación de fungicida (Mumford y Brett, 1982). En estas condiciones a los 2 meses se tiene 77 % de viabilidad y 41.4 % de agua. La pérdida de

viabilidad ocurrida durante los 8 meses de almacenamiento no es aceptable, si se piensa en términos de conservación de la diversidad.

En otros trabajos se ha buscado la forma de mantener estos materiales por mayor tiempo, por lo que han sugerido el empleo de cultivo *in vitro* de embriones somáticos o de ejes embrionarios extraídos de semillas sexuales; sin embargo, esta forma de conservación tiene el inconveniente de ser costosa y demandante de mucho trabajo, así como el riesgo de que se presente variación somaclonal en los materiales a conservar (Fang *et al.*, 2003; Pencer, 1991).

Una de las últimas técnicas empleadas para la conservación de materiales recalcitrantes (sensibles a la desecación) ha sido la crioconservación. Se han generado varios protocolos en especies recalcitrantes, como café (*Coffea spp.*), mangostan (*Garcinia mangostana* L.), en especies intermedias, como papaya (*Carica papaya* L.) y en varias especies ortodoxas (Takagi, 2000). Desafortunadamente se han generado pocos protocolos para el manejo de cacao. Fang *et al.* (2003) generaron un protocolo para conservar embriones somáticos por medio de encapsulamiento y deshidratación empleando pretratamientos con diferentes crioprotectores, obteniendo alto porcentaje de sobrevivencia de los embriones tratados y generando plantas sanas. Por otro lado, Pence (1991) con embriones sexuales inmaduros de cacao y empleando congelamientos lentos antes del congelamiento rápido en nitrógeno líquido y concluye que el uso de embriones inmaduros tiene una mayor posibilidad de sobrevivencia en crioconservación.

LITERATURA CITADA

Alemanno L, M Berthouly, N Michaux-Ferrière (1997) A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant. 33 :163-172

Are L A (1964) Drying treatments to keep cocoa seeds viable in storage. FAO. Conf. Rome. 1-6 p.

- Barton L V (1965)** Viability of seeds of *Theobroma cacao* L. Contributions from Boyce Thompson Institute 23:109-122.
- Berjak P, N M Pammenter (2000)** What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 12: 22-55.
- Black M, Pritchard H W (2000)** Desiccation and Survival in Plants: Drying without Dying. Hardback. Londo. 416 p.
- Blackman S A, R L Obendorf, A C Leopold (1992)** Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. Plant Physiology 100: 223-230.
- Buitink J, M Hemminga, F Hoekstra (2000)** Is there a role for oligosaccharides in seed longevity? An assessment of intracellular glass stability. Plant Physiology 122: 1217-1224
- Caruso A, D Morabito, F. Delmore, G Kahlem and S. Carpin (2002).** Dehydrin induction during drought and osmotic stress in *Populus*. Plant Physiologi Biochemical 40: 1033-1042.
- Chacón P, R O Bustamente (2001)** The effects of seed size and pericarp on seedling recruitment and biomass in *Cryptocarya alba* (Lauraceae) under two contrasting moisture regimes. Vegetatio 152: 137-144.
- Changrun L, W Q Sun (1999)** Desiccation sensitivity and activities of free radical-scavenging enzymes in recalcitrant *Theobroma cacao* seeds. Seed Science Research 9: 209-217.
- Chin H F (1975)** Germination and storage of rambutan (*Nephelium lappaceum*) seeds. Acta Horticulture 74: 173-180.
- Chin H F (1978)** Production and storage of recalcitrant seeds in the tropics: seed problems. Acta Horticulture 83: 17-21.

Close J T (1996) Dehydrins: emergence of biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiology Plant* 97: 795-803.

Colmenero F J M, L P Moreno, C E Smith and A A Covarrubias (1999) Pvlea-18, a member of a new late embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. *Plant Physiology* 120: 93-103.

Cuevas S A J (2004) Semillas recalcitrantes: importancia, características y alternativas para su conservación. Publicaciones del Programa Nacional de Etnobotánica. Recursos naturales # 5 Séptima edición. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 14 p.

Cuming A C (1999) LEA proteins. *In: Seed Proteins*. P. R. Shewry and R. Casey (eds.). Kluwer Academic Publshing The Netherlands. pp: 753-780.

Dure L, M Crouch, J Harada, T Ho, J Mundy, R Quatrano, T Thomas and R Z Sung (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology* 12: 475-486.

Dussert S, N Chabrilange, F Engelmann, F Anthony, S Hamon (2000) Cryopreservation of coffe (*Coffea Arabica* L.) seeds: toward a simplified protocol for routine use in coffe genebanks. *In: Cryopreservation of tropical plant germoplasm. Current research progress and application*. Engelmann F. and Takagi H. Editors. IPGRI. Rome. pp 161-166..

Fang Yi-Jong, A Wetten, P Hadley (2003) Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos for long-term germplasm storage. *Plant Science* 166: 669-675.

Farnsworth E (2000) The ecology and physiology of viviparous and recalcitrant seeds. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31:107-138

Farrant M J, W N Pammenter, P Berjak (1993) Seed development in relation to desiccation tolerance: A comparison between desiccation-sensitive (recalcitrant) seed of *Avicennia marina* and desiccation tolerant types. *Seed Science Research* 3: 1-13.

Farrant M J, W N Pammenter, P Berjak, Farnsworth, W C Vertucci (1996) Presence of dehydrin-like proteins and levels of abscisic acid in recalcitrant (desiccation sensitive) seed may be related to habitat. *Seed Science Research* 6: 175-182.

Greggains V, W E Finch-Savage, W P Quick, N M Aherton (2000) Putative desiccation tolerance mechanisms in orthodox and recalcitrant seeds of the genus *Acer*. *Seed Science Research* 10:317–327.

Guilloteau M, M Laloi, D Blais, D Crouzillat, J McCarthy (2003) oil bodies in *Theobroma cacao* seeds: cloning and characterization of cDNA encoding the 15.8 and 16.9 kDa oleosins. *Plant Science* 164: 597-606.

Hanson J. (1984) “The storage of seeds of tropical tree fruits” *In: Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation*. Holden, J.H.W. y Williams, J.T. (eds.). George Allen & Unwin, London. pp: 53-62.

Hendry G A, W E, Finch-Savage, P C Thorpe, N M Atherton, S M Buckland, K A Nilsson, E Seel (1992) Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in recalcitrant species *Quercus robur* L. *New Phytology* 122: 273-279.

Ismail, M. A., E. A. Hall and T. J. Close. (1999). Purification and partial characterization of dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. *Plant Physiology* 120: 237-244.

- Kainer K, M Duryeaa, M Malavasi, E Rodrigues de Silva, J Harrison (1999)** Moist storage of Brazil nut seeds for improved germination and nursery management. *Forest Ecology and Management* 116: 207-217.
- Karsen C M (1995)** Hormonal regulation of seed development, dormancy, and germination studied by genetic control. *In: Seed Development and Germination*. J Kigel, G Galili (eds). Marcel Dekker, New York. pp: 333-396.
- Kermode A R (1997)** Approaches to elucidate the basis of desiccation-tolerance in seeds. *Seed Science Research* 7: 75-95.
- Kermode A R, W E Finch-Savage (2002)** Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. *In: Desiccation and survival in plants. Drying without dying*. Black M, H W Pritchard (eds). CABI Publishing. pp: 149-184.
- King M W, Roberts E H (1979)** The Storage of Recalcitrant Seeds. Achievements and Possible Approaches. IBPGR, Rome. Italy. 96 p.
- Leprince O, G A F Hendry, B D McKersie (1993)** The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Science Research* 3: 231- 246.
- Leprince O, J Buitink, F A Hoesktra (1999)** Axes and cotyledons of recalcitrant seeds of *Castanea sativa* Mill. exhibit contrasting responses of respiration to drying in relation to desiccation sensitivity. *Journal experimental Botany* 50:1515-1524.
- Loomis W D, J Battaile (1966)** Plant phenolic compounds and isolation of plant enzymes. *Phytochemistry*. 5: 423-438.

- López A A P, N V H Delgado, M A Azpeitia, A J López, C J Jiménez, F A Rodríguez, S L Fraire, C R Castañeda (2003)** El cacao en Tabasco: manejo y producción. INIFAP. Tabasco. México. 81 p.
- Moreno F, G Plaza, S Magnitskiy (2006)** Efecto de la testa sobre la germinación en la semilla de caucho (*Hevea brasiliensis* Muell.) Agronomía Colombiana. 25: 290-295.
- Mumford M. P. and C. Brett A. (1982)** Conservation of cacao seed. Tropical Agriculture. 59: 306-310.
- Nosti N J (1953)** Cacao, Café y Te. Ed. Salvat Barcelona España. 97-111p
- Nylander M, J Svenson, T E Palma and V B Welin (2001)** Stress induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology 45: 263-279.
- Pence C V (1991)** Cryopreservation of immature embryos of *Theobroma cacao*. Plant Cell Reports 10: 144-147.
- Rizhsky, L., H. Liang and R. Mittler. (2002).** The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. Plant Physiology 130:1143-1151.
- Roberts E H (1973)** Predicting the storage life of seeds. Seed Science and Technology 1: 499-514.
- Sossou J D, V Hoher, N Ferrière, C Fulcheri, P Morard, L Alemanno (2002)** Histological and biochemical characterization of *Theobroma cacao* L. endosperm during seed development. Seed Science research 12:91-100
- Soulages J L, K Kim, L E Arrese, C Walters and C J Cushman (2003)** Conformation of group 2 Late Embryogenesis Abundant protein from soybean. Evidence of poly (L-Proline)-type II structure. Plant Physiology 131: 963-975

- Sun W Q (1999)** State and phase transition behaviors of *Quercus rubra* seed axes and cotyledonary tissues: Relevance to desiccation sensitivity and cryopreservation of recalcitrant seeds. *Cryobiology* 38: 372-385
- Takagi H. (2000)** Recent developments in cryopreservation of shoot apices of tropical species. *In: Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application.* Engelmann F. and Takagi H. (eds). IPGRI. Rome. pp: 178-193
- Tommasi F, C Paciolla, O Arrigoni (1999)** The ascorbate system in recalcitrant and orthodox seeds. *Physiologia Plantarum* 105: 193-198.
- Tweddle J C, J B Dickie, C C Baskin, J M Baskin (2003)** Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *Journal of Ecology* 91:294-304
- Vertucci W C, M J Farrant.(1995)** Acquisition and loss of desiccation tolerance.*In: Seed development and germination.*Kigel, J and Galili, G. (Eds). Editorial Marcel Dekker, New York. pp: 237-371.
- Wood G A R (1982)** Cocoa. Editorial Continental. México. pp: 23-35

III. ANATOMÍA E HISTOQUÍMICA DE *Theobroma cacao* L., CON ÉNFASIS EN SEMILLA MADURA

ANATOMY AND HISTOCHEMISTRY OF *Theobroma cacao* L., WITH EMPHASIS IN MATURE SEED.

Rangel Fajardo Ma. Alma¹, Zavaleta Mancera Hilda Araceli^{2*} Córdova Téllez Leobigildo¹, Delgado Alvarado Adriana³, Villegas Monter Angel¹, López Andrade Alejandro Procopio⁴, Vidales Fernández Ignacio⁵

RESUMEN

El género *Theobroma* se distribuye en Sudamérica pero *Theobroma cacao* L. la especie es originaria de México y pocos son los estudios anatómicos de esta especie. El estudio de la semilla es importante ya que son la principal fuente de propagación, que son clasificadas como recalcitrantes, sin embargo, poco se sabe sobre su anatomía. Información de su estructura ayudara a elucidar alternativas para su conservación *Ex situ*. Se estudió la anatomía del desarrollo de la semilla desde el estadio de botón floral hasta semilla madura. Botones, flores y semillas en diferentes estados de desarrollo se fijaron en FAA y se obtuvieron cortes seriados (10 µm), se tiñeron con safranina y verde fijo. Cortes de tejido fresco se usaron para tinciones específicas para almidón, lípidos y proteínas. Resultados: El óvulo es anátropo, crasinucelar y bitégmico. El saco embrionario es del tipo polygonum. El embrión presento un desarrollo lento, rodeado de endospermo líquido al inicio del desarrollo de la semilla hasta que esta alcanza su longitud final a la madurez. El tegumento interno y la mesotesta quedan colapsados en la semilla madura. La

¹ Colegio de Postgraduados. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad.

² Colegio de Postgraduados. Instituto de Recursos Naturales* Autor responsable arazavaleta@colpos.mx. Tel. 595 9520200 ext. 1360

³ Colegio de Postgraduados. Campus Puebla.

⁴ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Huimanguillo. Tabasco.

⁵ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Uruapan. Michoacán.

exotesta esta formada de dos estratos celulares en la semilla madura; un estrato interno de células isodiamétricas de paredes delgadas y lumenes grandes y el estrato externo formado por células alargadas filiformes. En las semillas maduras el endospermo queda reducido a una delgada capa, de dos estratos celulares, unida a los cotiledones fuertemente plegados. Las principales sustancias de reserva de los cotiledones son almidones y proteínas aunque también se encuentran algunos depósitos de taninos.

Palabras clave: *Theobroma cacao* L., Esterculiaceae, anatomía, histoquímica, semilla.

ABSTRACT

The *Theobroma* is distributed in South America but the specie *Theobroma cacao* L. has its origin in Mexico and there are few anatomical studies of this species. Is the study of the seeds important since they are the main source of propagation. The cacao seeds are classified like recalcitrant seeds, nevertheless, little is known about its. Structural information could help to elucidating alternatives for their conservation *Ex-situ*. Anatomy of seed development was performed from budflowers stated to mature seed. Buds, flowers and seeds at different states of development were fixed in FAA and sections (10 μ m) were obtained and stained with safranin and fix green. Fresh sections were used for stains: starch, lipids, tannin and proteins. Results: The ovule is anatropous, crasinucelar and bitegmic. The embryo sac is type polygonum. The embryo showed a slow develop surrender in endosperm liquid at the beginig of seed development until it reaches the final length at maturity. The internal and the mesotest were collapsed at the mature stage. The exotest was formed by two layers in the mature seed; one internal layer of isodiametric cells of thin walls and large lumen and one the external layer formed by filiform cells . In mature seeds the endosperm was reduced to a thin layer, of two cells attached to the strongly folded cotyledons. The main substances was starch and proteins in cotyledons, also some deposits of tannin were detected.

Key words: *Theobroma cacao* L., sterculiaceae, seed, anatomy, histochemistry.

INTRODUCCIÓN

El género *Theobroma* es tropical y se distribuye en forma natural en los estratos medios de las selvas cálidas húmedas del hemisferio occidental, entre las latitudes de los 18° N (Veracruz, Tabasco; México) y los 15° S (Brasil y Bolivia), y desde el nivel del mar hasta los 1,000 m (Cuatrecasas, 1964).

El cacao (*Theobroma cacao* L.) fue conocido por los mayas, quienes lo llamaron “cacau”; el fruto se usó para elaborar bebidas y su consumo estuvo asociado a la riqueza y poder. Los mayas establecieron las primeras plantaciones cacaoteras en Centroamérica. Para los aztecas, el cacao tenía significado religioso (Díaz, 1955). Esta especie es una de las aportaciones del descubrimiento del nuevo mundo y las semillas son la materia prima en la industria chocolatera. Roberts (1973) reporta que las semillas de esta especie son recalcitrantes debido a que son susceptibles a la desecación y pierde la viabilidad en menos de una semana al reducir su contenidos de agua a 30 % .

La estructura de las semillas recalcitrantes juega un papel importante en la sensibilidad a la desecación, por ejemplo las cubiertas duras y el grosor de las mismas actúan como barreras para prevenir la deshidratación y en ocasiones evitan la imbibición por lo que se ven directamente relacionadas con el nivel de desecación de la semilla (Moreno *et al.*, 2006; Farnsworth, 2000; Chacón y Bustamente, 2001; Baskin y Baskin, 2000). Así las de fibras y sacos de mucílago funcionan como barreras impermeables (Werker, 1997)

Existe poca información respecto a la anatomía, fisiología y conservación de la semilla de cacao. Corner (1976) describe brevemente la anatomía, pero él mismo reconoce que aún es

insatisfactoria tal descripción. En el presente trabajo se analiza la estructura y algunos aspectos de la composición de la semilla de *Theobroma cacao* L. en las primeras etapas de desarrollo y madura, mediante técnicas convencionales de microscopia de luz y pruebas histoquímicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

En septiembre del 2006 y marzo del 2007 se realizaron dos muestreos de un genotipo criollo de *Theobroma cacao* L. en la colección de campo de cacao del Instituto Nacional de Investigaciones Forestal, Agrícola y Pecuaria (INIFAP), ubicado en el predio “El Danubio” a 18° 14’ 24” latitud N y 93° 12’ 00” longitud O a 10 m de altitud en el municipio de Comalcalco, Tab. En ambos muestreos se obtuvieron botones, flores y semillas de frutos en diferentes etapas de desarrollo hasta la madurez de corte, agrupados en ocho intervalos según la longitud del fruto: 3.0-5.9, 6.0-8.9, 9.0-11.9, 12.0-14.9, 15.00-17.9, 18.0-20.9, 21.0-23.9 y > 25 cm. Se midió el largo, ancho y espesor a semillas maduras de tres frutos y se determinó el color de los cotiledones con ayuda de una tabla de color (Küppers, 2000).

Para el estudio anatómico, la mitad del material (botones, flores y frutos) se fijaron en una solución de FAA (10% formaldehído, 5% ácido acético glacial, 50% etanol y 35% agua destilada) (Ruzin, 1999). Los frutos en diferentes estados de desarrollo se conservaron congelados hasta su evaluación histoquímica.

El material fijado en FAA se lavó y deshidrató en series de etanol (50, 75, 90 y 100%) y xileno para su inclusión en parafina. Se obtuvieron cortes (10 a 15 μ m) seriados transversales y medianos, que fueron teñidos con safranina “O”(0.05% safranina, 2 % p/v cloruro de sodio (NaCl) en etanol 50%) y verde fijo FCF (0.12% de verde fijo FCF en etanol 95%).

Para el estudio histoquímico se realizaron las siguientes tinciones específicas en tejido fresco: lípidos con rojo "O" de aceite (0.5% p/v rojo "O" de aceite, 25% v/v de 1-butanol, 75% v/v etilenglicol) según Zavaleta-Mancera y Engleman (1991); almidón con I₂KI (0.5% de yoduro de potasio en agua destilada y yodo elemental hasta saturación); lignina con fluoroglucinol (2 % en etanol) y ácido clorhídrico(50 %); polisacáridos insolubles (PAS) con ácido periódico y reactivo de Schiff (Jensen, 1962 modificada por Engleman, (1991)); proteína con negro azul de naftol (Fisher, 1968) y taninos con vainillina- ácido clorhídrico (Gardner, 1975). De los datos recabados se obtuvieron medias ± error estándar.

RESULTADOS

Ovario. Es supero de cinco carpelos unidos, con número variable de óvulos (25 a 30) arreglados en dos filas por carpelo, los cuales presentan placentación axial (Figura 1 E). En corte transversal (Figura 1 A) se observan dos óvulos por lóculo unidos al eje axial del fruto donde se encuentra tejido vascular.

Óvulo. Uno de los óvulos de cada par, en vista transversal, se degrada después de antesis. El óvulo viable es anátropo, bitégmico y crasinucelado (Figura 1C). El tegumento externo (*te*) tiene de 4 a 5 estratos de células de parénquima, y el tegumento interno (*ti*) de 2 a 3 estratos de células pequeñas de parénquima; el *ti* es más corto y el *te* forma el micrópilo. La calaza está bien delimitada, irrigada por el tejido vascular que entra por el hilio y recorre el rafe para llegar a la calaza. En la semilla madura el tejido vascular se puede observar colapsado en la testa, corriendo desde la calaza hasta cerca del micrópilo (Figura 1 B).

Nucela. Es recta crasinucelar (de varios estratos), presente aun en frutos de 21.0 a 23.9 cm, pero que finalmente es absorbida en la semilla madura (frutos de >25 cm).

Saco embrionario. El estudio de cortes seriados de ovarios en anthesis reveló que el saco embrionario está formado por siete células y ocho núcleos, tres sinérgidas, dos antípodas, una célula huevo y dos núcleos centrales (Figura 1 B).

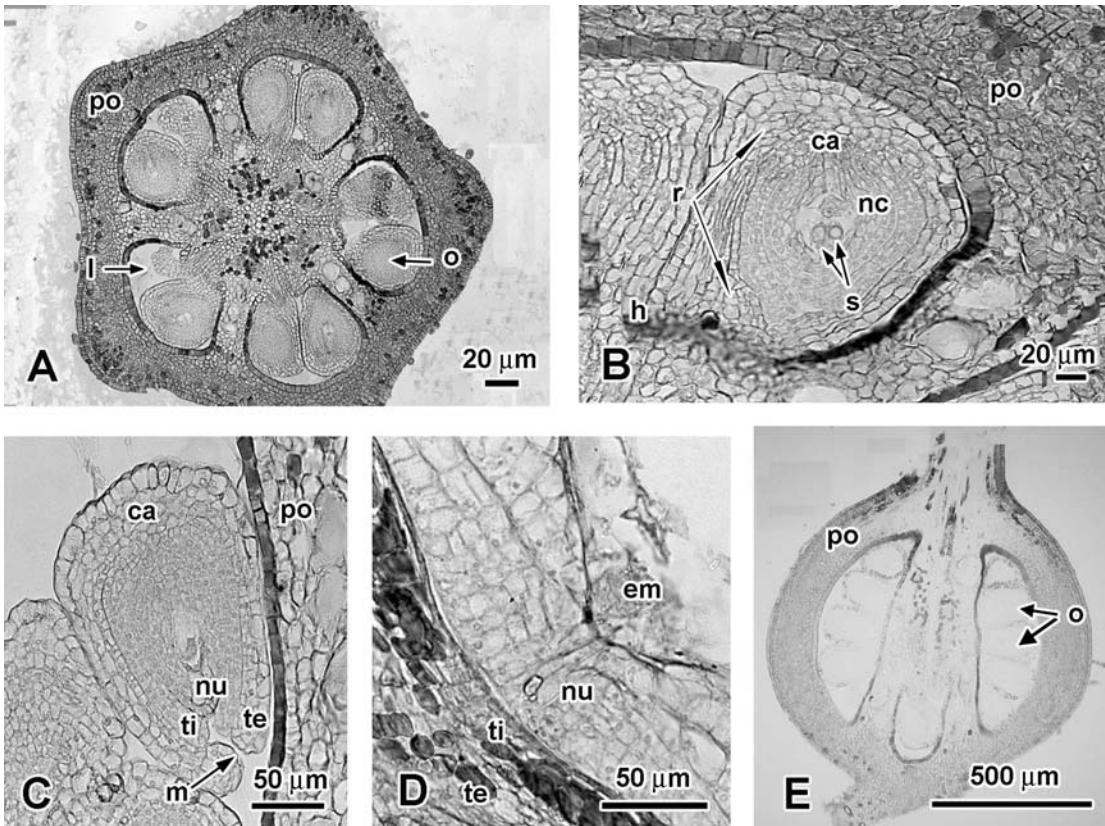


Figura 1. Óvulo y desarrollo temprano de *Theobroma cacao* L. A) Corte transversal del ovario de una flor en anthesis. B) Corte mediano de óvulo en anthesis. C) Corte transmediano del óvulo en anthesis. D) Semilla inmadura (1 cm de longitud) con embrión en estado globular. E) Corte mediano del ovario. po: pared del ovario, l: lóculos, o: óvulos. ti: tegumento interno, ca: calaza, un: nucela, te: tegumento externo, m: micrópilo, r: rafe s: sinérgidas, nc: núcleos centrales, em: embrión, en: endospermo, h: hilo.

Tegumentos. En semillas inmaduras (1 cm de longitud) de frutos de 18.0 a 20.9 cm el tegumento interno presenta de tres a cuatro estratos celulares de formas isodiamétricas y con paredes delgadas, las cuales quedan colapsadas en la semilla madura (frutos de > 25 cm de

longitud); el tegumento externo presenta una exotesta de dos estratos y la mesotesta de 25 a 27 estratos, de las cuales las más cercanas al tegmen son pequeñas que durante el desarrollo se colapsan. En la semilla madura la exotesta la forman dos estratos de células, de las cuales la más interna son grandes ($10 \pm 0.5 \mu\text{m}$) de paredes muy delgadas, el estrato más externo de células son alargadas como fibras ($15 \pm 0.5 \mu\text{m}$ de largo y $2 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ancho) y presentan paredes delgadas (Figura 3 A y B).

Desarrollo de la semilla. Dentro del fruto, el 50 % de los óvulos por lóculo fueron viables. El desarrollo del embrión es lento con respecto al resto de la semilla y el fruto. Así, en semillas de 1 cm de longitud (frutos de 18.0 a 20.9 cm longitud) solo se localizaron embriones en etapa globular (Figura 1 D), posteriormente en semillas de 1.5 a 2 cm (frutos de 21.0-23.9 y >25 cm de longitud) se observaron embriones en diferentes etapas de desarrollo (Figura 2 A, B, C, D, E, F y G), con cotiledones y eje embrionario aplanados dorsiventralmente, localizados cerca del micrópilo y suspendidos en el endospermo de consistencia gelatinosa. En las semillas de 2.5 cm (longitud promedio final, frutos >25 cm de longitud) se observaron embriones que ocupaban de 85 a 95 % del volumen de la semilla, el resto de la semilla estaba ocupado por el endospermo líquido (no celular), los cotiledones están fuertemente plegados y algunos inician a tornarse púrpura ($M_{99}Y_{90}C_{99}$), coloración característica del genotipo; finalmente en la semilla madura el endospermo es absorbido casi en su totalidad, reduciéndose a una delgada película transparente de dos a tres capas de células que rodea a los cotiledones.

Semilla madura. Es ovoide de 2.4 ± 0.12 cm de longitud y 1.4 ± 0.08 cm y 0.85 ± 0.07 cm de ancho y espesor respectivamente. Los cotiledones se encuentran fuertemente plegados rodeando por completo al eje embrionario (Figura 2H), cilíndrico de color blanquecino, el cual mide de 0.7 a 0.8 cm. Los cotiledones presentan coloración púrpura o blanca dependiendo del tipo de material

genético [púrpura (M₉₉Y₉₀C₉₉): clones e híbridos trinitarios y forasteros; blancos (N₀₀Y₀₀M₀₀): criollos].

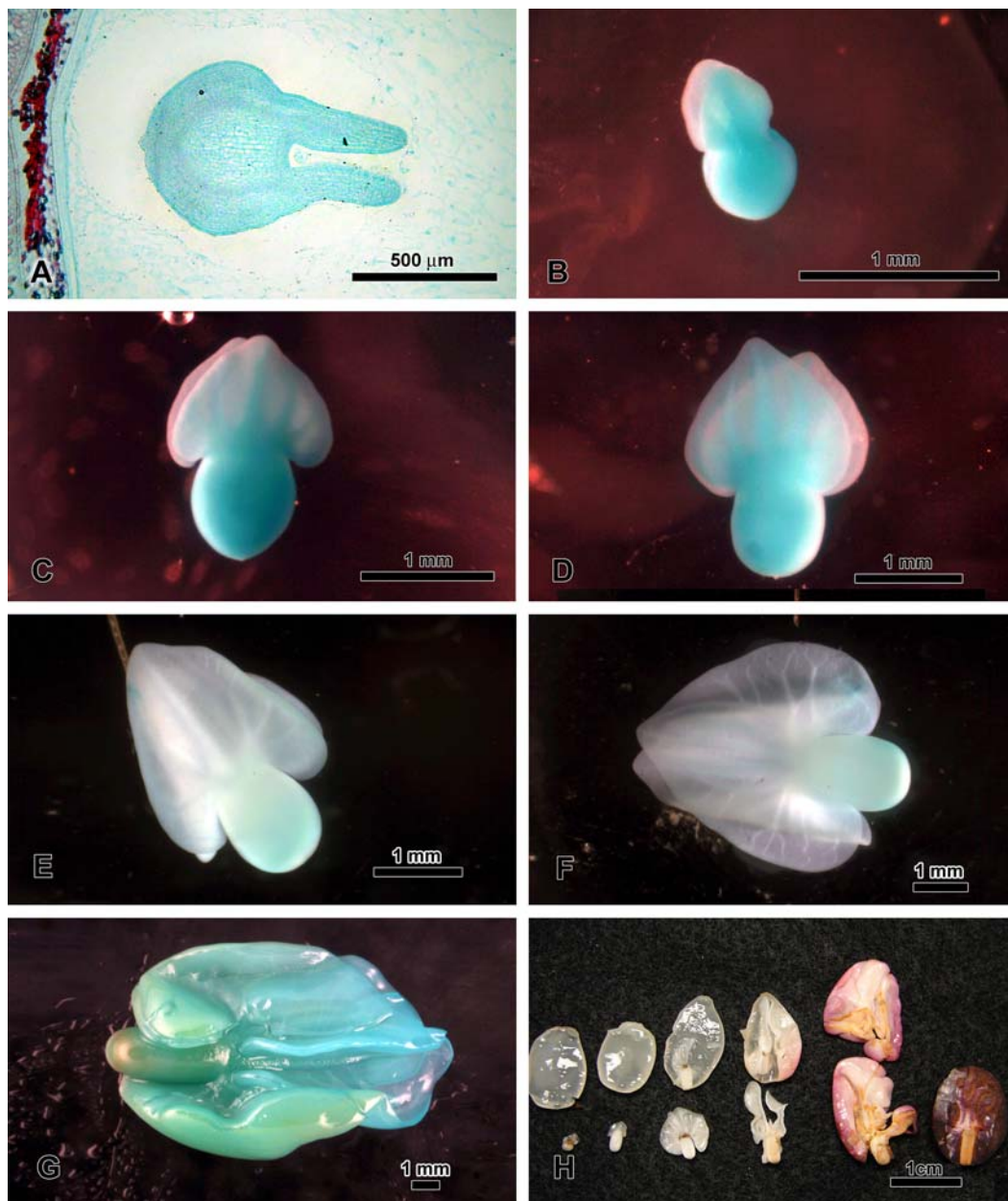


Figura 2. Cambios en el desarrollo del embrión en semillas de cacao de frutos de 21 a > 25 cm de longitud. A) Embrión suspendido en endospermo líquido dentro de la semilla. B), C) y D) Embrión en posición dorsiventral, cotiledones sin plegar, E) y F) Embrión con cotiledones comenzando a plegarse, G) Embrión con cotiledones plegados, H) Secuencia de desarrollo del embrión desde estado inmaduro hasta la semilla madura.

Las pruebas histoquímicas indican que las principales sustancias de reserva en los cotiledones son: proteína (Figura 3C) y almidón (Figura D), también se localizaron células aisladas idioblastos con taninos condensados en sus lumenes (Figura 3 E y F).

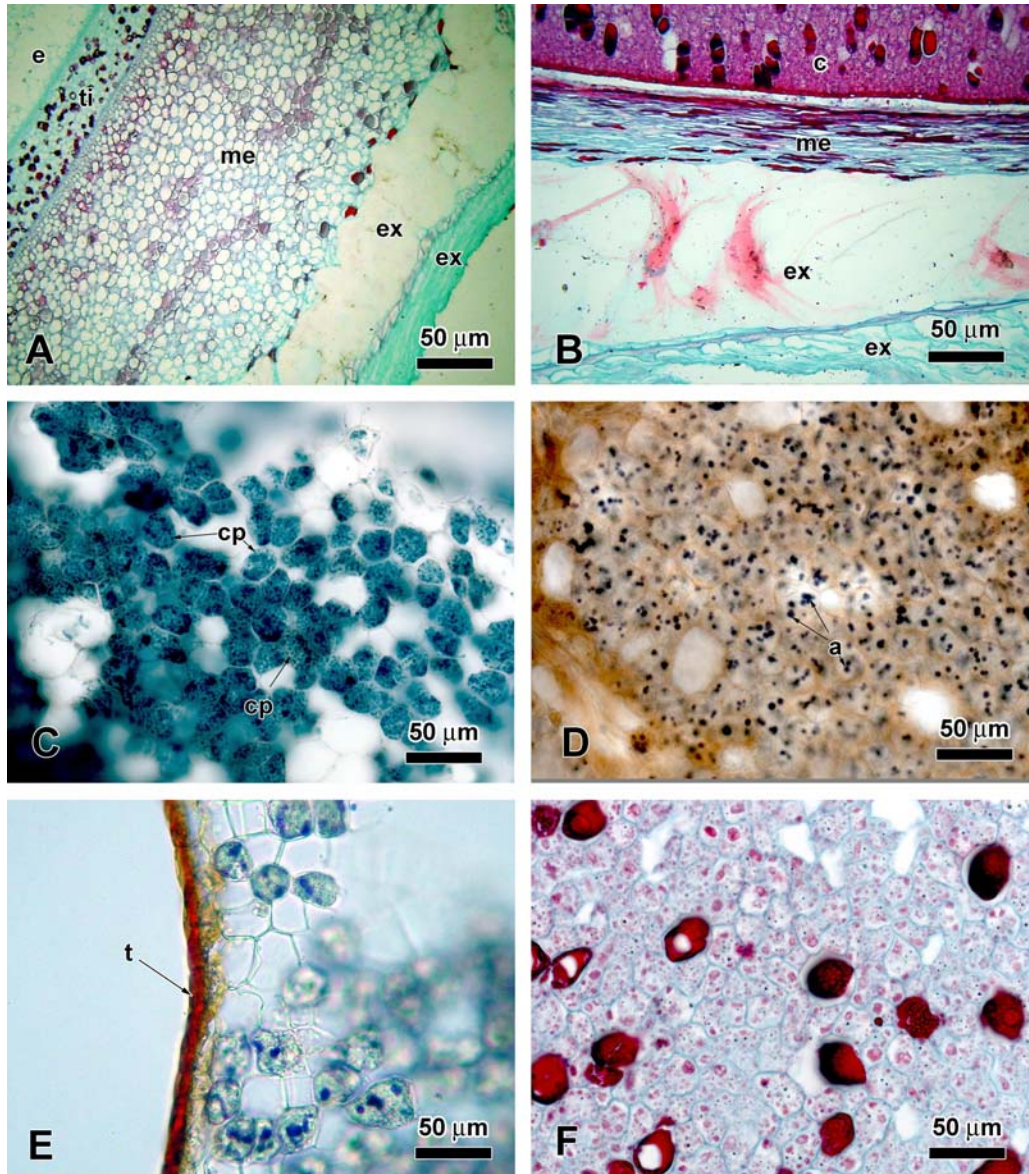


Figura 3. Desarrollo de testa y análisis histoquímico en semillas de *Theobroma cacao* L. A: Testa de semilla inmadura (1 cm longitud de frutos de 18.0-20.9 cm longitud). B: Testa de semilla madura (fruto de >25 cm de longitud). C: Células de cotiledones con cuerpos de proteína. D) Almidón. E) Taninos. F) Taninos condensados en cotiledón. e: endospermo, ti: tegumento interno, me: mesotesta, ex: exotesta, c: cotiledón, id: idioblastos, cp: cuerpo de proteína, a: almidón, t: taninos.

DISCUSIÓN

El ovario de *Theobroma* es supero, con cinco carpelos unidos; los óvulos presentan placentación axial denominado sicarpico. Previo a la antesis se observaron dos hileras de óvulos por lóculo, de los cuales uno de cada par aborta después de la antesis.

Las observaciones realizadas confirman que el óvulo de *Theobroma cacao* L. es anátropo, bitégmico de nucela recta y crasinucelar, características que han sido observadas en otros miembros de la familia Sterculiaceae a la cual pertenece este género (Corner, 1976). El saco embrionario presenta siete células y ocho núcleos, y pudiera decirse que es del tipo polygonum (Johri, 1963); sin embargo, es necesario realizar el seguimiento del desarrollo completo para determinar si pertenece a este tipo de desarrollo. Después de la fecundación el desarrollo del embrión es lento, lo que coincide con lo señalado por Sossou *et al.* (2002) y Alemano *et al.* (1996), quienes indican que el cigoto se mantiene en estado unicelular hasta por seis semanas, mientras que el fruto y la semilla continúan su crecimiento; esta es una de las principales razones por las cuales solo se identificó el embrión en estado globular en semillas de 1 cm de longitud, mientras que en semillas de 2 y 2.5 cm se identificaron embriones con primordios cotiledonares en crecimiento cerca del micrópilo, rodeados por endospermo líquido compuesto por cenocitos (núcleos sin paredes) que fue absorbido por el embrión durante el desarrollo. En la madurez, el endospermo es una capa delgada transparente que rodea a los cotiledones plegados, en acuerdo con lo reportado por Martini *et al.* (2008) y Figueiredo (1986).

En la semilla madura se observaron cotiledones fuertemente plegados en donde se identificaron principalmente cuerpos de proteína y almidón, así como taninos condensados e idioblastos: Martini *et al.* (2008) reportan a los lípidos como el principal elemento de reserva, seguido de

proteínas, almidón y en menor cantidad polisacáridos. En el presente estadio, estos elementos de reserva son acumulados en la última etapa de desarrollo de la semilla.

En la testa madura de *Theobroma* se observaron células epidérmicas delgadas y alargadas radialmente como tricomas, son poco comunes en semillas de testas duras, pero es una característica que comparte las familias como Malvaceae, Asclepiadaceae y Saliaceae, aunque pueden aparecer de manera esporádica en algunas especies como protección o para ayudar a la dispersión. Werker (1997) señala que los tricomas en la testa pueden estar relacionados a la mixospermia e hidrocoria una característica de especies de la familia de las Sterculiaceae (de Araújo y Bergemann, 1999).

Las semillas de cacao muestran características anatómicas que se relacionan con protección de la misma a la pérdida excesiva de humedad, cotiledones completamente plegados rodeando al eje embrionario, presencia de sacos de mucílago y las células epidérmicas alargadas relacionadas con mixospermia. Además de compartir algunas características típicas de las semillas recalcitrantes como la presencia de endospermo líquido y retardado crecimiento del embrión al igual que la presencia de un eje embrionario reducido con respecto al tamaño de los cotiledones.

LITERATURA CITADA

Alemanno L, M Berthouly, N Michaux-Ferrière (1996) Histology of somatic embryogenesis from floral tissues in *Theobroma cacao* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 46: 187-194.

Alemanno L, M Berthouly, N Michaux-Ferrière (1997) A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 33: 163-172.

- Baskin C C, J M Baskin (2000)** Ecology and evolution of specialized seed dispersal, dormancy and germination strategies. *Plant Species Biology* 2:95-96
- Chacón P, R O Bustamente (2001)** The effects of seed size and pericarp on seedling recruitment and biomass in *Cryptocarya alba* (Lauraceae) under two contrasting moisture regimes. *Vegetatio* 152: 137-144.
- Corner (1976)** The seeds of dicotyledons. Vol. 1. Cambridge University Press. pp: 258-265.
- Cuatrecasas J (1964)** Cacao and its allies. A taxonomic revision of the genus *Theobroma*. Contributions from the United States National Herbarium 35: 379-614.
- De Araújo N C J, Bergemann de A I (1999)** Desarrollo ontogénico de plántulas de *Guazuma ulmifolia* (Sterculiaceae). *Revista de Biología Tropical* 47: 785-790
- Espinosa-Osornio G, M E Engleman (1998)** Breve recopilación de anatomía de semillas (Notas del curso). Colegio de Postgraduados. Texcoco. México. 45 p.
- Farnsworth E (2000)** The ecology and physiology of viviparous and recalcitrant seeds. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31:107-138
- Ferreira S (2003)** Estrutura e histoquímica do sementes do genero *Theobroma* L. Teses Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais. U. Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. Brasil.
- Figueiredo L F S (1986)** Conservação da viabilidade da semente de cacau. II. Tipificação do fruto e descrição da sementes e da germinação. *Revista Theobroma* 16: 75-88.
- Johri M B (1963)** Female gametophyte. *In: Recent advances in the embryology of angiosperms.* Maheshwari, P (Ed). International society of plant morphologists. University of Delhi, India. pp: 69-103.

- Martini H M, G Lenci, C Figueira, De Q Tavares (2008)** Localization of the cotyledon reserves of *Theobroma grandiflorum* (Hill. ex Spreng.)K. Schum., *T. subincanum* Mart., *T. bicolor* Bonpl. and their analogies with *T cacao* L. Revista Brasileira do Botânica 31: 147-154.
- Moreno F, G Plaza, S Magnitskiy (2006)** Efecto de la testa sobre la germinación en la semilla de caucho (*Hevea brasiliensis* Muell.) Agronomía Colombiana 25: 290-295.
- Ruzin E S (1999)** Plant Microtechnique and Microscopy. Oxford University Press. New York. 321 p.
- Sossou J D, V Hoher, N Ferrière, C Fulcheri, P Morard, L Alemanno (2002)** Histological and biochemical characterization of *Theobroma cacao* L. endosperm during seed development. Seed Science research 12: 91-100.
- Werker E (1997)** Seed Anatomy. Enciclopedia of plant anatomy. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Zavaleta- Mancera A, V Hernández, M S C Sánchez, M E Engleman (2003)** Anatomía de la semilla de *Cupania dentata* (Sapindaceae) con énfasis en semilla madura. Anales del Instituto de Biología. Universidad Autónoma de México. Serie Botánica 74: 17-29
- Zavaleta-Mancera H A, E M Engleman (1991)** Anatomía de la semilla de *Casimiroa edulis* (Rutaceae). “zapote blanco”, durante su desarrollo. Boletín de la Sociedad Botánica de México 51:67-81

IV. TOLERANCIA A LA DESECACIÓN DE LAS SEMILLAS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) DE TRES ORÍGENES GENÉTICOS

DESICCATION TOLERANCE OF CACAO SEED (*Theobroma cacao* L.) OF THREE GENETIC ORIGINS

Rangel Fajardo Ma. Alma¹, Córdoba Téllez Leobigildo¹ *, López Andrade Alejandro Procopio², Delgado Alvarado Adriana³, Zavaleta Mancera Hilda Araceli⁴, Villegas Monter Ángel¹

RESUMEN

Las semillas recalcitrantes, como *Theobroma cacao* L. mueren durante el secado, pero el contenido de agua al cual esto ocurre puede variar en genotipos de la misma especie. Se evaluó la sensibilidad a la desecación en genotipos de cacao y se cuantificaron cambios físicos en semillas en la última etapa de desarrollo. Mazorcas de Pound 7 y EET 48 (Forasteros), UF667 y UF668 (Trinitarios) y Carmelo (Criollo) fueron cosechadas a los 5, 6 y 7 meses después de floración. En tres repeticiones de 15 semillas recién extraídas se midió el largo, ancho, espesor, contenido de agua inicial y peso seco. Las semillas se secaron a 300, 200 y 150 g H₂O·kg⁻¹ pf, usando como testigo una muestra recién extraída. El daño por secado se midió mediante germinación y viabilidad celular en cortes histológicos de ejes embrionarios. La humedad de las semillas entre cosechas y genotipos fluctuó entre 529 y 706 g H₂O·kg⁻¹ pf valores correspondientes a EET 48 y Carmelo, respectivamente. El peso seco se incrementó 2.5 g (236 %) de la cosecha uno a la tres y hubo incrementos de 0.06 y 0.40 cm en el ancho y espesor de la semilla. Con contenido de agua

¹ Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Km 36.5 Carretera México-Texcoco. cp 56230. * Autor responsable: lcordova@colpos.mx, Tel. 595 9520200 ext. 1555

² Instituto de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Huimanguillo. Tabasco.

³ Colegio de Postgraduados. Campus Puebla

⁴ Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Instituto de Recursos Naturales.

en la cosecha la germinación alcanzó 94 %, que disminuyó en promedio a 50 y 0 % al reducir a 300 y 200 g H₂O·kg⁻¹ pf, resultando menos sensibles a 300 g H₂O·kg⁻¹ los genotipos EET 48 y UF667. Los genotipos Carmelo, Pound 7 y UF668 mostraron 98 % de núcleos celulares, que bajo en promedio a 50 y a 0 % con 300 y 200 g H₂O·kg⁻¹ pf, respectivamente. Se concluye que la sensibilidad a la desecación varía entre genotipos de los tres orígenes genéticos a 300 g H₂O·kg⁻¹, pero ninguno tolera secado a 200 g H₂O·kg⁻¹.

Palabras clave: *Theobroma cacao* L., contenido de humedad, madurez, recalcitrancia, viabilidad celular.

ABSTRACT

Seeds recalcitrant such as *Theobroma cacao* L. die during the drying, but the moisture content at which it takes place may vary among genotypes within the same species. Desiccation sensitivity to drying in genotypes of cocoa and physical changes of the seed during the last stage of development was quantified. Ears of Pound 7 and EET48 (“Forasteros”), UF667 and UF668 (Hybrids) and Carmelo (“Criollo”) were harvested at 5, 6, and 7 months after flowering. Three replications of 15 fresh seeds were used to measure length, width, thickness, initial moisture content, and seed dry weight. Seeds were dried-down to 300, 200, and 150 g H₂Okg⁻¹ fw, using a fresh-seed sample as a negative control. Seed drying damage was evaluated with germination and cellular viability in dyed embryonic axes with fast green and safranin. Seed moisture content among harvests and genotypes vary between 529 and 706 g H₂Okg⁻¹ fw, values corresponding to EET 48 and Carmelo, respectively. Seed dry weight increased 2.5 g (236 %) from harvest one to three and there were increases of 0.06 and 0.40 cm in seed width and thickness. At harvest moisture content germination reached 94 %, that decreased in average to 50 and to 0 % as seed moisture content declined to 300 and 200 g H₂Okg⁻¹ fw, resulting less sensitive at 300 g H₂Okg⁻¹

¹fw genotypes EET 48 and UF667. Carmelo, Pound 7, and UF668 showed 98 % of cellular nuclei wich drop off to 50 and to 0 % with 300 and 200 g H₂Okg⁻¹fw, respectively. It can be concluded that sensitivity to drying of cocoa seed vary among genotypes of the three genetic origins at 300g H₂O•kg⁻¹fw, but none of them tolerates drying at 200 g H₂Okg⁻¹.

Key words: *Theobroma cacao* L., moisture content, maturity, recalcitrant, cellular viability

INTRODUCCIÓN

Las semillas ortodoxas toleran niveles de desecación hasta 5 %, que permite conservarlas por décadas a temperaturas inferiores a 0 °C en bancos de germoplasma. En contraparte las semillas recalcitrantes, como las de cacao (*Theobroma cacao* L.), mango (*Mangifera indica* L.), rambután (*Nephelium lappaceum* L.) y hule (*Hevea brasiliensis* L.) (King y Roberts, 1979), no toleran esos niveles de desecación y por consiguiente se dificulta el resguardo de germoplasma en cuartos fríos, debido a que el alto contenido de agua las torna sensibles al daño por congelamiento. Esto demanda la generación de procedimientos que permitan a la conservación *ex situ* del germoplasma de estas especies.

Las semillas ortodoxas adquieren la capacidad de tolerar la desecación durante la última etapa de desarrollo, detectándose cambios físicos (reducción de las vacuolas, reacción del citoesqueleto y desdiferenciación intracelular), fisiológicos (presencia y uso eficiente de sistemas antioxidantes) y bioquímicos [acumulación de moléculas de protección, LEA's ("Late Embriogenesis Abundant), sacarosa y oligosacáridos], que en conjunto confieren protección a las células durante la pérdida de agua (Pammenter y Berjak, 1999) y prolongan la longevidad de las semillas (Nkang, 2002).

El contenido de agua al cual la semilla muere, varía entre especies y dentro de la misma especie; en las semillas ortodoxas ese contenido fluctúa entre 3 y 7 % mientras que para las

recalcitrantes entre 12 y 31 % (Wesley-Smith *et al.*, 1992). Chin (1978) reportó que la viabilidad de semillas de "Alcanfor de Borneo" (*Dryobalanops aromatica* L.), cacao y rambután se redujo considerablemente con 35, 27 y 20 %, respectivamente. Por otro lado, Dursset *et al.* (1998) observaron que *C. arabica* mostraba sensibilidad a la desecación con contenidos de agua por debajo de 80 g H₂O·kg⁻¹ pf mientras que en *C. sessiliflora* y *C. racemosa* ésta se presentaba por abajo de 300 g H₂O·kg⁻¹ pf.

La diversidad genética del cacao cultivado en México está compuesta por germoplasma de los orígenes genéticos denominados trinitarios, criollos y forasteros (López *et al.*, 2003). Aún cuando se ha establecido que las semillas de esta especie son recalcitrantes, no se ha evaluado la sensibilidad a la desecación entre orígenes, lo que podría ayudar a elucidar los mecanismos que participan en la adquisición de la tolerancia a la desecación y buscar estrategias de conservación del germoplasma *ex situ* a mediano y largo plazo. En el presente trabajo se determinó la sensibilidad a la desecación de las semillas de cinco poblaciones de cacao con diferente origen genético mediante pruebas de germinación y viabilidad celular; además, se cuantificaron cambios físicos en la última etapa de desarrollo de la semilla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon "mazorcas" de cinco clones de cacao de tres orígenes genéticos: (1) criollo Carmelo, material endémico producto de la selección de los agricultores; (2) forasteros, Pound 7 de origen Peruano, (seleccionado por J. F. POUND, 1938) y EET48 de origen Ecuatoriano (seleccionado por EET PICHILINGUE, 1944), y (3) trinitarios, híbridos UF667 y UF668, originarios de Costa Rica (seleccionados por UNITED FRUIT CO.); todos los materiales están resguardados actualmente en el banco de germoplasma (colección de campo) del Instituto

Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Centro de Investigación Huimanguillo, Tab., localizado en el Km 1 de la carretera Huimanguillo-Cárdenas, Tab.

Se cosecharon “mazorcas” de los cinco genotipos a los 5, 6 y 7 meses después de la floración, considerando indicadores de color, tamaño y número de días después de floración. Las “mazorcas” se lavaron y desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5 % por 1 h y en seguida se extrajeron las semillas y se lavaron con agua abundante hasta retirar el mucílago.

Cambios físicos de la semilla

En cada cosecha y genotipo se midió el tamaño de la semilla en sus dimensiones largo, ancho y espesor en tres repeticiones de 15 semillas, inmediatamente después de la extracción; además, se determinó la humedad a 103 °C por 16 h (Changrun y Sun, 1999) y peso seco (peso después de 16 h a 103 °C), ambas en tres repeticiones de 15 semillas.

Tolerancia a la desecación

En cada cosecha, una vez que las semillas fueron extraídas se colocaron sobre toallas de papel entre 20 a 26 °C y de 70 a 75 % de humedad relativa para reducir el contenido de agua de las semillas a 300, 200 y 150 g H₂O·kg⁻¹ pf, teniendo como testigo el contenido de agua al momento de cosecha. El daño por secado se evaluó mediante germinación y viabilidad celular, en un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos, teniendo como factores cosecha, genotipos y niveles de humedad de secado.

Germinación: Se evaluó en las semillas con contenido de agua al momento de extracción y después de secado a 300, 200 y 150 g H₂O·kg⁻¹ pf en cada tratamiento, en muestras de 60 semillas en cuatro repeticiones de 15, colocadas entre toallas de papel de 24 x 23.5 cm (Marquis Georgia-Pacific) humedecidas con agua destilada. Éstas se enrollaron en forma de taco y se

colocaron en una cámara de germinación a 30 ± 1 °C (Mumford y Brett, 1982). El primer conteo se efectuó a los tres días y el segundo a los siete días después de la siembra, considerando semillas germinadas aquellas con protrusión radicular (King y Roberts, 1982).

Viabilidad celular: Esta variable se midió únicamente en la última cosecha, de cada clon de cada origen genético (Carmelo, Pound 7 y UF668) se usaron 5 ejes embrionarios. Los ejes se fijaron en FAA (10 % formaldehído, 5 % ácido acético glacial, 50 % etanol y 35 % agua destilada); en seguida se deshidrataron en series de alcohol y xileno para incluirlos en parafina (Ruzin, 1999). Se realizaron cortes (10 a 15 μ m) seriados longitudinales del eje radicular de y se tiñeron con safranina “O” (safranina al 0.05 %, NaCl al 2 % p/v en agua) y verde fijo FCF (verde fijo al 0.12 % en etanol al 95 %) (Zavaleta-Mancera y Engleman, 1991). Se utilizó el siguiente procedimiento por que en observaciones previas se detectó que la deshidratación afectaba la integridad nuclear visualizada como ausencia de núcleos en las células. Se contabilizaron los núcleos íntegros por campo visual (40X) en tres repeticiones de 50 células de meristemo apical, caliptra y eje embrionario con la ayuda de un microscopio Carl Zeiss Axiostar Plus; además, se obtuvieron imágenes con una cámara SONY DSC S85.

Los datos se analizaron con el paquete estadístico SAS para Windows 6.12, mediante el modelo completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos y la comparación de medias con la prueba de comparación de Tukey ($\alpha= 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cambios físicos de la semilla

El tamaño, contenido de humedad y peso seco de las semillas cambió significativamente a medida que la cosecha se realizó en un estado más avanzado de madurez, con diferencias entre genotipos (Cuadro 1). Entre las cosechas, el contenido de agua fluctuó considerablemente,

primero con reducción de $106.9 \text{ g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ pf}$ (15.9 %) de la cosecha uno a la dos, seguido de un incremento de $46.7 \text{ g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ pf}$ (6.9 %) de la cosecha dos a la tres. A pesar de ese comportamiento en el contenido de agua, la acumulación en peso seco incrementó significativamente en 1.2 (163 %) y 2.5 g (236 %) en la cosecha dos y tres, respectivamente, en comparación con la cosecha uno. Estos cambios se reflejaron en incrementos de 0.06 y 0.40 cm en el ancho y espesor de la semilla respectivamente de la cosecha uno a la tres, sin cambios significativos en el largo de las mismas.

Respecto al efecto de los genotipos (Cuadro 1), los forasteros mostraron mayor reducción de agua ($557.8 \text{ g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ pf}$), que representa 75 y 149 $\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ pf}$ inferior que los trinitarios y criollo, respectivamente. No obstante, los trinitarios acumularon más de 1.09 g de peso seco e incrementaron en más de 0.24, 0.11 y 0.13 cm el largo, ancho y espesor que los forasteros y criollo.

Cuadro 1. Promedios de las variables evaluadas en las semillas de cacao, resultado de los factores principales de variación.

Factores		Contenido de agua (gH ₂ O·kg ⁻¹ ·pf)	Peso seco (g)	Largo (cm)	Ancho (cm)	Espesor (cm)
Cosecha	(mdf)					
	5	672.74 a	1.83 c	2.45 a	1.35 b	0.45 c
	6	565.87 c	2.99 b	2.43 a	1.30 b	0.69 b
	7	612.59 b	4.32 a	2.41 a	1.41 a	0.85 a
	DHS	19.5	0.3017	0.0791	0.0574	0.0512
Genotipo	Trinitario					
	UF668	617.36 b	3.75 a	2.60 a	1.46 a	0.74 a
	UF667	645.76 b	3.76 a	2.68 a	1.47 a	0.79 a
	Forasteros					
	Pound 7	586.12 c	2.64 b	2.36 b	1.35 b	0.63 b
	EET48	529.62 d	2.69 b	2.20 c	1.22 c	0.56 b
	Criollo					
	Carmelo	706.5 a	2.40 b	2.30 c	1.29 c	0.59 b
	DHS	29.618	0.4583	0.1201	0.0872	0.0778

Medias con la misma letra en cada variable y para cada factor no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). mdf: meses después de floración.

El efecto interactivo genotipo por cosecha, se reflejó en el comportamiento diferencial de cada genotipo en función de la cosecha para las variables en estudio (Figura 1). El contenido de agua disminuyó significativamente en la cosecha dos, con ligero incremento en la cosecha tres en todos los genotipos, pero ninguno alcanzó niveles inferiores a 520 g H₂O·kg⁻¹ pf. EET 48 exhibió en promedio el menor contenido de agua (529 g H₂O·kg⁻¹ pf) en las tres cosechas, mientras que Carmelo mantuvo más de 700 g H₂O·kg⁻¹ pf y los otros genotipos se ubicaron entre estos dos (Figura 1A). La acumulación de peso seco incrementó conforme la semilla se cosecha en estado de madurez más avanzado, pero los híbridos UF667 y UF668 mostraron la máxima acumulación (3.75 g) durante el periodo de evaluación, mientras que Carmelo (2.40 g) y Pound 7 (2.64 g) mostraron la menor tasa y acumulación de peso (Figura 1B). La longitud (información no

mostrada) y ancho cambiaron ligeramente en todos los genotipos (Figura 1C), mientras que el espesor incrementó en promedio 0.40 cm de la cosecha uno a la tres para la mayoría de los genotipos (Figura 1D).

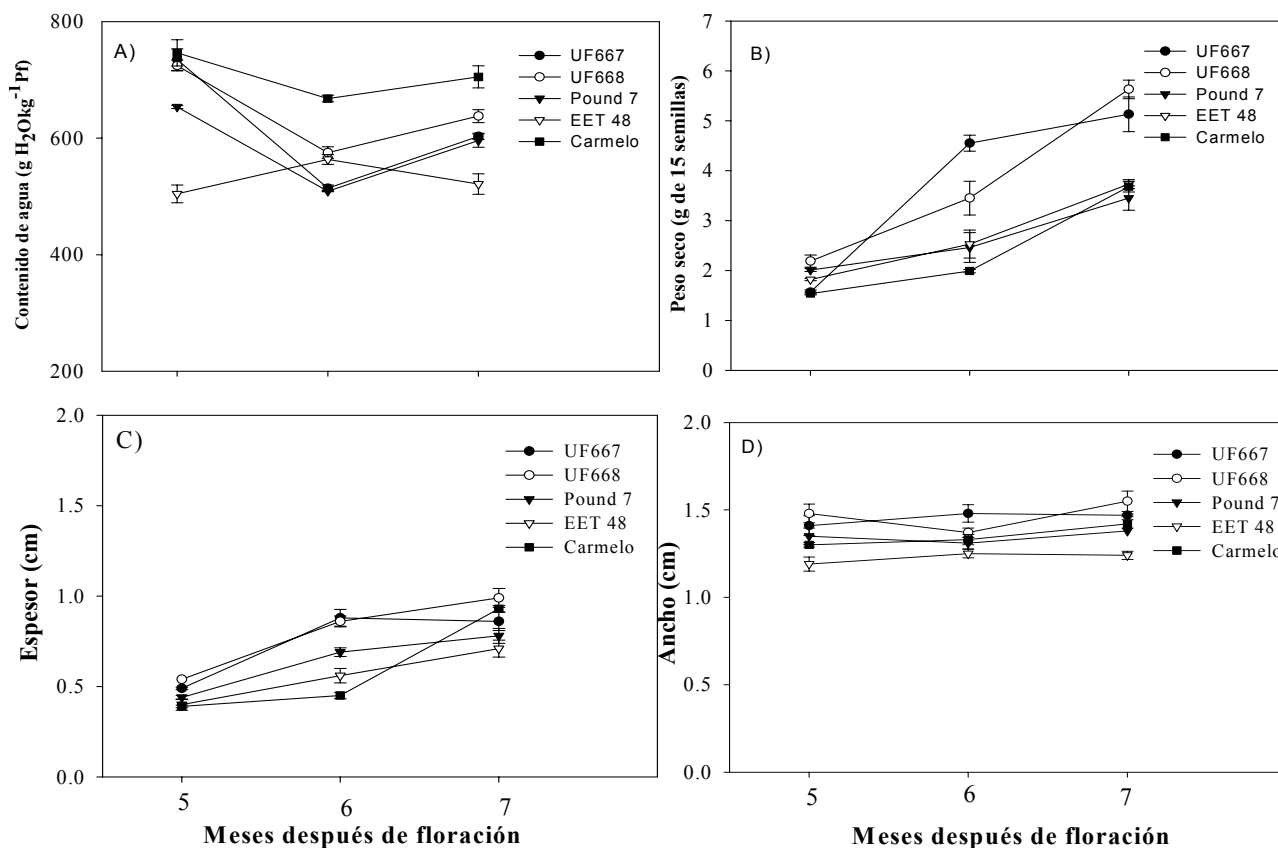


Figura 1. Características físicas de cinco genotipos de cacao a los 5, 6 y 7 meses después de floración. A) Contenido de agua; B) Peso seco, C) Espesor y D) Ancho.

Resulta difícil discutir por separado los cambios físicos que experimentaron las semillas durante el periodo de evaluación por la interacción entre cosechas y genotipos. Las semillas ortodoxas presentan una clara tendencia a reducir el contenido de agua conforme avanza la etapa de acumulación de materia seca y madurez de la misma (Chandel *et al.*, 1995), mientras que las recalcitrantes tienden a conservar altos contenidos de humedad y fluctuaciones durante la manifestación de reducciones mínimas (Berjak y Pammenter, 2000), comportamiento que

coincide con los datos obtenidos para semilla de cacao, especie recalcitrante (Pence, 1991), en el presente estudio. El alto contenido de agua ($> 520 \text{ g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}\text{pf}$) que mantienen las semillas de todos los genotipos en madurez comercial del fruto (cosecha 7 mdf) (Figura 1 A), es superior al reportado en semilla madura (400 y 450 $\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}\text{pf}$), pero similar al del eje embrionario (650 y 700 $\text{g H}_2\text{O kg}^{-1}\text{pf}$) en ese estado de madurez (Chandel *et al.*, 1995), esta diferencia depende del manejo del fruto después de cosecha e incluso al nivel nutricional de la planta madre y de las condiciones ambientales presentes en la cosecha (Magnitskiy y Plaza, 2007) e inclusive al procedimiento usado para determinar esta variable, debido a que la semilla pierde agua rápidamente al exponerse al ambiente una vez desprendidas del fruto. Lo sobresaliente en el presente trabajo fue el reducido contenido de agua que mantuvo el genotipo EET48 respecto al resto durante el periodo de evaluación, que alcanzó 177 $\text{g H}_2\text{O kg}^{-1} \text{ pf}$ menos respecto a Carmelo (Figura 1 A), lo que significa menor sensibilidad a la deshidratación de este genotipo durante la última etapa de desarrollo de la semilla, que podría deberse a cambios intracelulares y bioquímicos que previenen daños celulares.

El peso seco de la semilla mostró tendencia a incrementar durante el periodo de estudio en todos los genotipos, pero los híbridos UF667 y UF668 mantuvieron la mayor tasa de acumulación y lograron mayor incremento (Figura 1 B), lo que puede ser el resultado del mejoramiento genético (vigor híbrido), sobre todo si la selección fue para mayor rendimiento. Para todos los genotipos, el aumento de peso se reflejó en incrementos en espesor y sin cambios significativos en largo y ancho de la semilla, debido a que esta característica de la semilla queda definida a los 85 días después de polinización (Alemano *et al.*, 1997), fecha rebasada en la primera cosecha del presente experimento.

Tolerancia a la desecación

Germinación. El grado de madurez, los genotipos, niveles de secado y sus interacciones ejercen efecto interactivo en la sensibilidad a la desecación, evaluada mediante cambios en germinación. El efecto de cosecha se reflejó en mayor germinación (45 %) a los 6 mdf, que fue superior en 10 y 20 % al obtenido en la primera y tercera cosecha, respectivamente. En promedio EET 48 mantuvo el mayor porcentaje de germinación (41 %), que superó 19 % a Carmelo, que presentó menor valor, y 2, 4 y 5 % a UF667, UF668 y Pound 7, respectivamente (Figura 2).

El efecto del secado se reflejó en reducción significativa de la germinación y la muerte total de la semilla conforme éste fue más severo. Con 617 g H₂O·kg⁻¹ pf de cosecha la germinación alcanzó 94 %, que disminuyó en más de 50 % al reducirla a 300 g H₂O·kg⁻¹ pf y en 100 % cuando se redujo por abajo de 200 g H₂O·kg⁻¹ pf.

En la interacción cosecha x genotipos (Figura 2A), resultó evidente el intervalo en germinación que existe en la cosecha uno, que va desde 18 % para Carmelo hasta 50 % para EET 48. En la cosecha dos todos los genotipos alcanzaron como máximo 50 %, excepto Carmelo con 22 %. En la cosecha tres, todos los genotipos redujeron la germinación a 22 %, máximo alcanzado por Carmelo en el periodo de estudio.

En la interacción cosecha x nivel de secado (Figura 2B), la germinación se redujo conforme el secado fue más severo. Con el contenido de agua inicial, la germinación incrementó de 80 a 100 % de la cosecha uno a la dos, valor que se mantuvo en la cosecha tres; no obstante, al reducirla a 300 g H₂O·kg⁻¹ pf la germinación disminuyó en más de 20 puntos porcentuales en la cosecha uno y dos, y en 100 % en la cosecha tres.

En la interacción genotipos x niveles de secado (Figura 2C), la germinación disminuyó conforme el secado fue más severo, pero de manera diferencial entre los genotipos. Pound 7 y

EET 48 mostraron 100 % de germinación antes de secado, mientras que los genotipos UF667 y UF668 solo alcanzaron 90 % y Carmelo 88 %. Al reducir el contenido de agua de la semilla a $300 \text{ g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ pf, Carmelo redujo la germinación en 100 %, EET 48 y UF668 en 35 %, UF667 en 27 % y POUND 7 en 57 %. Ningún genotipo germinó con $200 \text{ g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ pf.

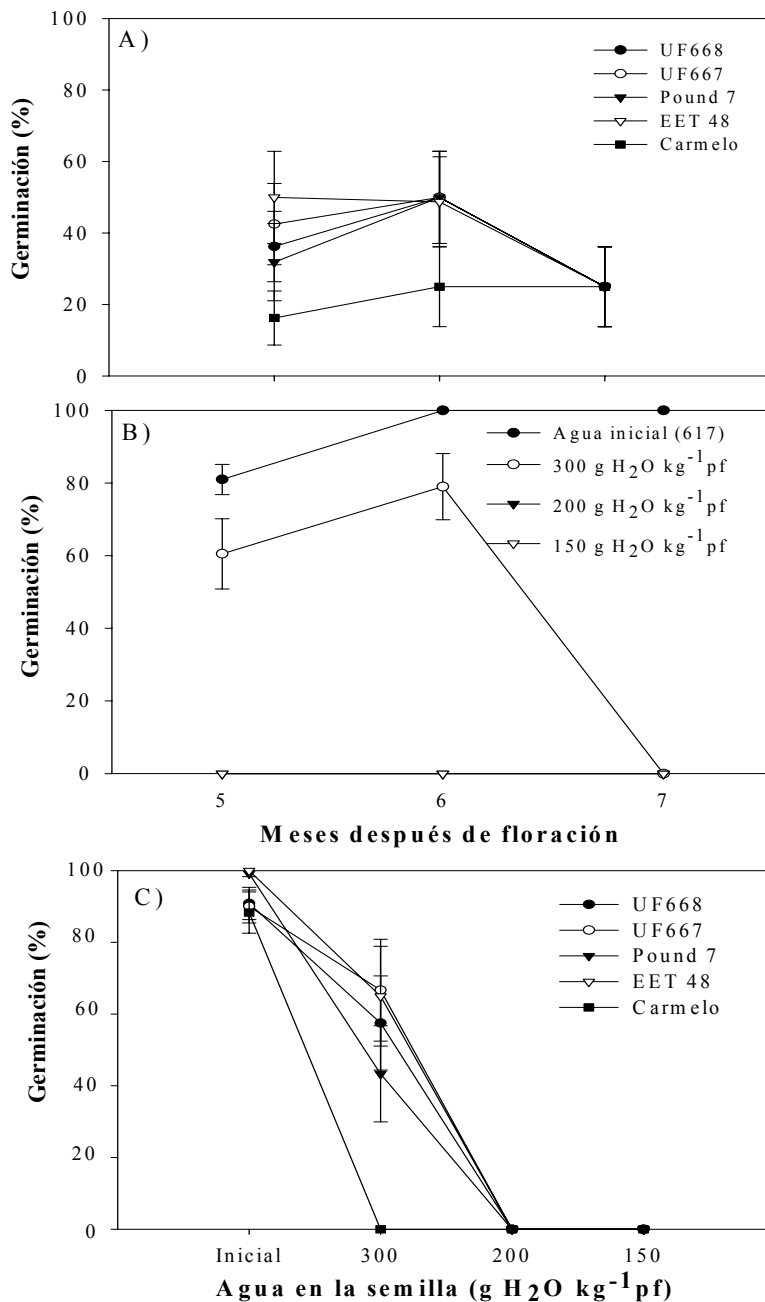


Figura 2. Germinación de cinco genotipos de cacao. A) en tres fechas de cosecha., B) secados a diferentes contenidos de agua., C) promedio de germinación en semillas con diferentes contenidos de agua en tres fechas de cosechas.

Viabilidad celular. Los genotipos y nivel de secado y su interacción mostraron efecto significativo en la visualización del núcleo al microscopio, indicativo de mantenimiento de viabilidad celular (Cuadro 2). De los tres genotipos sometidos a esta prueba, UF668 mantuvo la

mayor viabilidad celular (46 %) duplicando a Carmelo que tuvo el menor porcentaje (24 %). El secado causó daño celular y el núcleo dejó de ser visible al microscopio, con contenido de agua inicial fue posible observar 98 % de núcleos, valor que se redujo 50 % al reducir el agua de las semillas a 300 g H₂O·kg⁻¹ pf y 100 % al secar por debajo de 200 g H₂O·kg⁻¹ pf. Las células más afectadas fueron las del eje embrionario comparado con las del meristemo y caliptra.

Cuadro 2. Promedios de núcleos (viabilidad celular) en meristemo radicular, cuerpo del eje embrionario y caliptra en semillas de cacao de tres genotipos para tres fuentes de variación.

Factores		Viabilidad celular (%)
Genotipo		
	UF668	46 a
	Pound 7	42 b
	Carmelo	24 c
DHS		0.529
Agua (gH ₂ Okg ⁻¹ pf)		
	Inicial	617 98 a
	300	50 b
	200	0 c
	150	0 c
DHS		0.671
Tejido		
	Meristemo radicular	40 a
	Caliptra	38 b
	Eje embrionario	34 c
DHS		0.529

Medias con la misma letra en cada variable y para cada factor, no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

En las interacciones los tres genotipos presentan 100 % de núcleos visibles antes de someterse a secado, pero al reducir a 300 g H₂O·kg⁻¹ pf Carmelo dejó de mostrar viabilidad celular, mientras que UF668 y Pound 7 conservan 86 y 66 %, que se pierde por completo por debajo de 200 g H₂O·kg⁻¹ pf (Figura 3A). En la interacción niveles de secado por tejidos (Figura 3 B), la

diferencia de daño celular se hace evidente al disminuir el agua a $300 \text{ g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ pf, donde el meristemo radicular conserva el 60 % de viabilidad celular. La interacción tejido por genotipo revela que Carmelo presenta mayor sensibilidad al secado en los tres tejidos, mientras que UF668 es menos sensible en los tres tejidos (Figura 3C).

Ningún genotipo toleró reducciones en el contenido de agua inferiores a $200 \text{ g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ pf, en donde no fue posible observar núcleos, pero sí la manifestación de espacios intercelulares más pronunciados, señal probable de colapso celular (Figura 4 A, B, C y D).

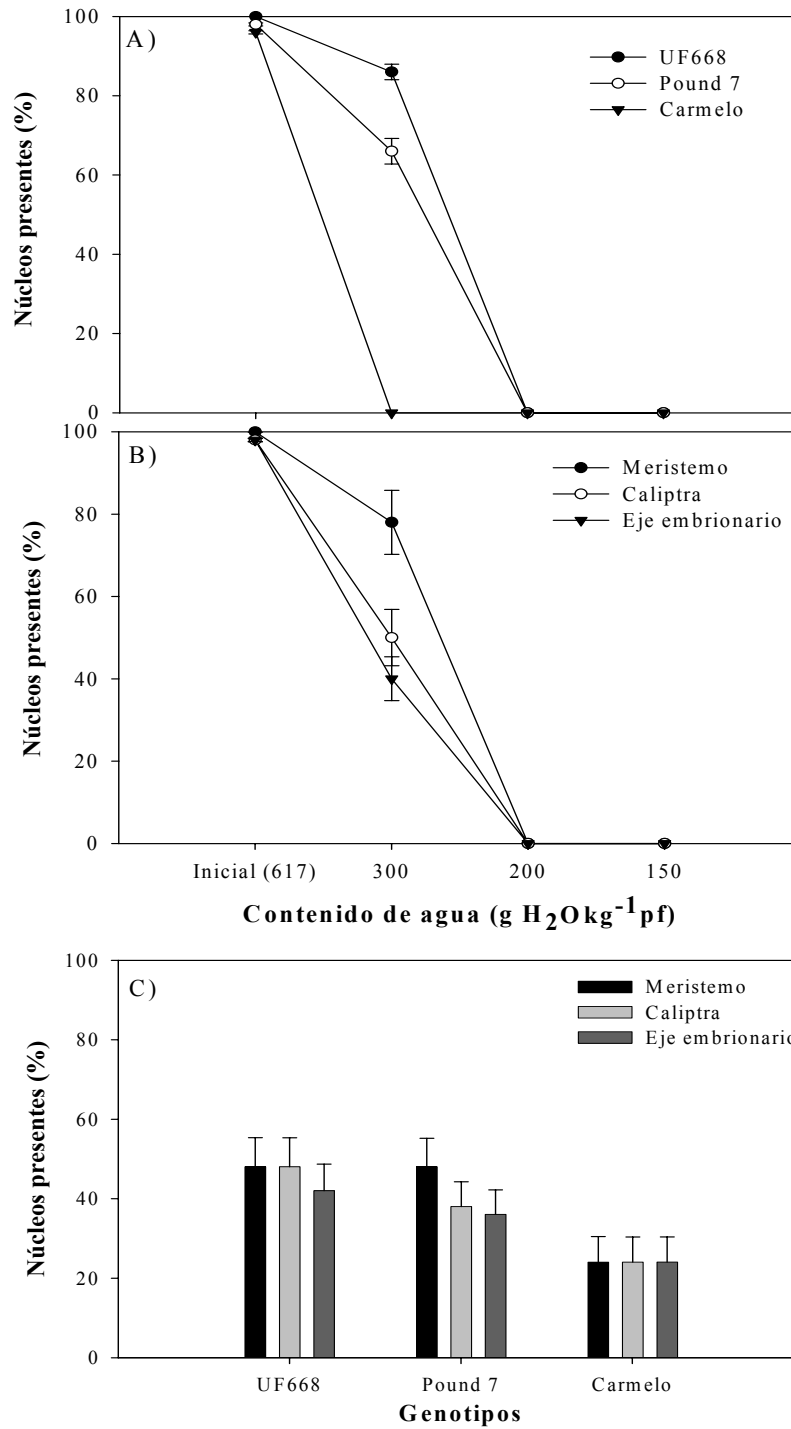


Figura 3. Porcentaje de núcleos en células de tres genotipos de cacao en tres zonas del eje embrionario. A) Núcleos en tres genotipos con diferentes contenidos de agua., B) Núcleos en tres zonas del eje embrionario a diferentes contenidos de agua. C) Núcleos en tres zonas del eje embrionario. Los datos son promedios \pm SE (n=50)

Durante el periodo de estudio, en las semillas que no fueron sometidas a secado, la germinación aumentó de 80 a 100 % de la cosecha uno a la dos, debido posiblemente a la reducción de embriones inmaduros y latentes por la falta de madurez, características que manifiestan varias especies (*i.e. Annona glabra*) del tipo recalcitrantes (Mata y Moreno-Casasola, 2005). Al someterse a secado, la germinación y viabilidad celular disminuyeron hasta perderse por completo, lo que dependió del nivel de secado, grado de madurez de la semilla y genotipo.

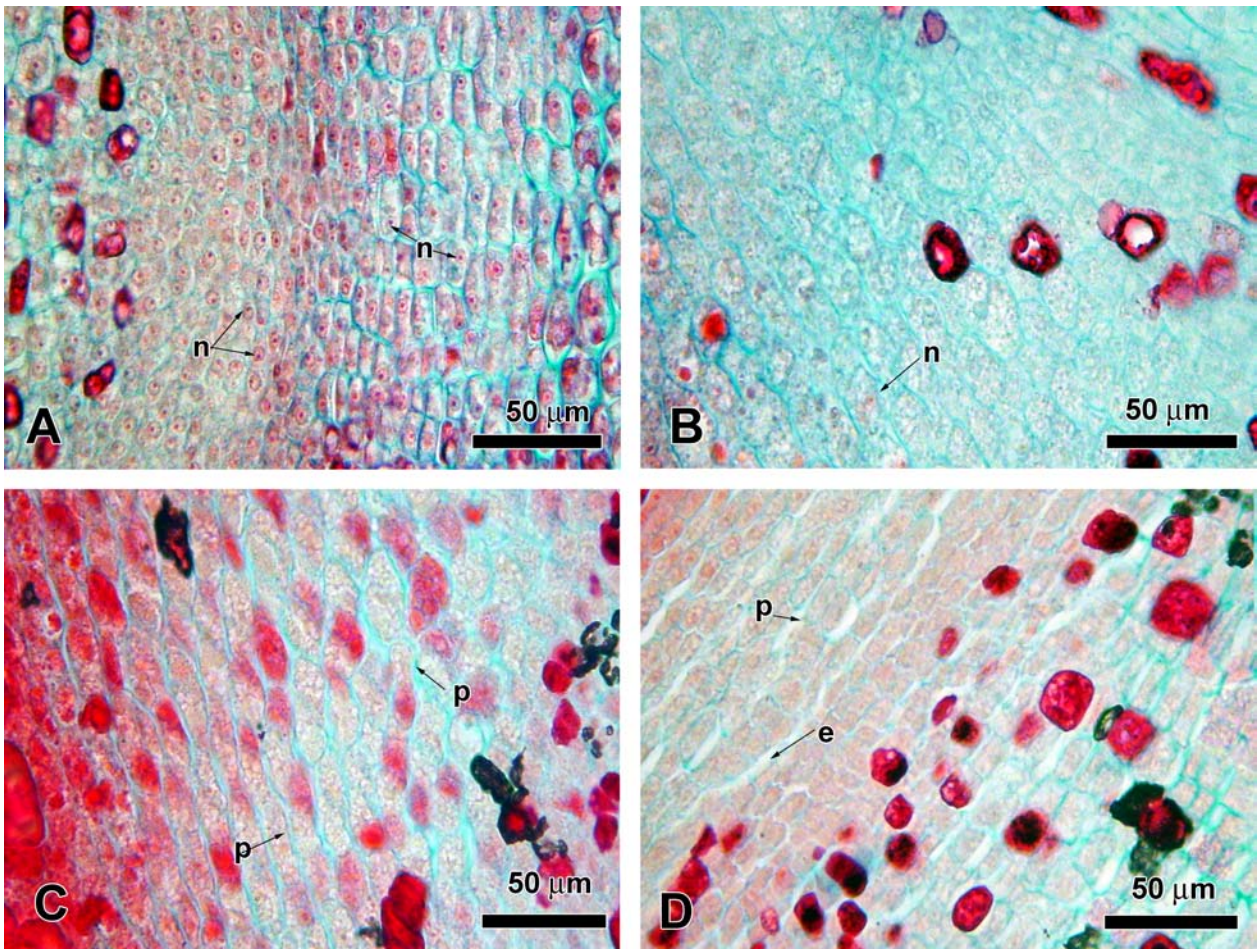


Figura 4. Cortes de radículas de embriones de cacao en el meristemo de raíz del eje embrionario. A) contenido de agua inicial; B) C) y D) con 300, 200 y 150 g H₂O kg⁻¹ pf , respectivamente. n: núcleo; p: pared celular; e: espacio intercelular. Observa la reducción de núcleos presentes en semillas sometidas a secado (C y D).

La reducción a $300 \text{ g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ pf provocó la muerte de las semillas de Carmelo, mientras que UF667 y EET48 manifestaron germinación superior a 70 %. Estos datos revelan menor sensibilidad de esos genotipos a la desecación y la existencia de esta diferencia entre clones de la misma especie, tal como lo señalan Berjark y Pammenter (2000).

EET 48 y UF667 mantuvieron la germinación más alta ($>41 \%$), aun con $300 \text{ g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$ pf lo que indica menor sensibilidad a la desecación en comparación con el resto de genotipos evaluados que se mantuvieron por debajo de este porcentaje y que confirman la existencia de diferencia en los grados de tolerancia a la desecación entre individuos de la misma especie (Berjark y Pammenter, 2000), Esto puede estar relacionado al contenido de agua y a la acumulación de peso seco ya que EET 48, fue el que mostró el menor contenido de agua durante el periodo de estudio y UF667 la máxima acumulación de peso seco, ambos componentes podrían ser la causa de la menor sensibilidad al secado de estos genotipos. El menor contenido de agua podría promover la acumulación de compuestos de protección contra la desecación y de peso seco reducir el espacio ocupado con agua, causando que la célula colapse con menores contenidos de humedad.

Se sabe que existen diferencias en la sensibilidad a la desecación entre especies del género, como *Coffea* (Dursset *et al.*, 1998) y *Dipterocarpus* (Tompsett, 1987), pero pocos se conoce sobre las diferencias entre genotipos de la misma especie. El contenido de agua en las células es de vital importancia para el mantenimiento de la integridad física de las membranas sin embargo, existen otros factores que también ayudan a prevenir la desintegración de las mismas (Pammenter y Berjak, 1999), desafortunadamente en las semillas recalcitrantes como en cacao el nivel de agua crítico es variable dentro de la misma especie e incluso dentro de los mismos tejidos

(Golovina *et al.*, 2001), pero como organismos se tiene un nivel limite en el cual la viabilidad se pierde por completo y en este caso no toleraron la reducción de agua a 200 g H₂O·kg⁻¹ pf.

CONCLUSIONES

La semilla de los tres orígenes de germoplasma de cacao presentes en México son recalcitrantes, pero existen diferencias en la sensibilidad a la desecación entre genotipos de cada origen. EET 48 de origen Ecuatoriano y UF667 híbrido Costarricense, fueron menos sensibles a la pérdida de agua. Contenidos de 300 g H₂O·kg⁻¹ pf, mantuvo más de 50 % de germinación y viabilidad celular. Ningún genotipo toleró niveles de desecación inferiores a 200 g H₂O·kg⁻¹ pf, en el que las semillas mueren, las células no muestran núcleos visibles y se aprecia colapso celular.

LITERATURA CITADA

- Alemano L, M Berthouly, N Michaux-Ferriere (1997)** A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 33: 163-172.
- Berjak P, N M Pammenter (2000)** What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 12: 22-55.
- Chandel S P K, R Chaudhury, J Radhamani, S K Malik (1995)** Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seeds of tea, cocoa and jackfruit. Annals of Botany 76: 443-450.
- Changrun L, Q Sun Wendel (1999)** Desiccation sensitivity and activities of free radical-scavenging enzymes in recalcitrant *Theobroma cacao* seeds. Seed Science Research 9: 209-217.

Chin H F (1978) Production and storage of recalcitrant seeds in the tropics: seed problems. *Acta Horticulture* 83: 17-21.

Dussert S, N Chabrillange, F Engelmann, F Anthony, J Louarn, S Hamon (1998)

Cryopreservation of seeds of four coffee species (*Coffea Arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. *Seed Science Research* 8: 9:15.

Golovina A E, F A Hoekstra, A C VanAelst (2001) The competence to acquire cellular desiccation tolerance in independent of seed morphological development. *Journal of Experimental Botany* 52: 1015-1027.

King W M, E H Roberts (1979) The Storage of Recalcitrant Seeds. Achievements and Possible Approaches. IBPGR, Rome. Italy. 96 p.

King W M, E H Roberts (1982) The imbibed storage of cocoa (*Theobroma cacao* L) seeds. *Seed Science and Technology* 10: 535-540.

López A A P, N V H Delgado, M A Azpeitia, A J López, C J Jiménez, F A Rodríguez, S L Fraire, C R Castañeda (2003) El cacao en Tabasco: manejo y producción. INIFAP. Tabasco. México. 81 p.

Magnitskiy S V, A G Plaza (2007) Fisiología de semillas recalcitrantes de árboles tropicales. *Agronomía Colombiana* 25: 96-103.

Mata I D, P Moreno-Casasola (2005) Effect of *in situ* storage, light, and moisture on the germination of two wetland tropical trees. *Aquatic Botany* 83: 206-218.

Mumford M P, C A Brett (1982) Conservation of cacao seed. *Tropical Agriculture* 59: 306-310.

- Nkang A (2002)** Carbohydrate composition during seed development and germination in two sub-tropical rainforest tree species (*Erythrina caffra* and *Guilfoylia monostylis*). *Journal Plant Physiology* 159: 473-483.
- Pammenter W N, P Berjak (1999)** A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research* 9: 13-37.
- Pence C V (1991)** Cryopreservation of immature embryos of *Theobroma cacao*. *Plant Cell Reports* 10: 144-147.
- Ruzin E S (1999)** *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press. New York. 321 p.
- Tompsett P B (1984)** Desiccation studies in relation to the storage of Araucaria seeds. *Annals of Applied Biology* 105: 581-586.
- Tompsett P B (1987)** Desiccation and storage studies on Dipterocarpus seeds. *Annals of Applied Biology* 110: 371-379.
- Wesley-Smith J, C W Vertucci, P Berjak, N W Pammenter, and J Crane (1992)** Cryopreservation of desiccation-sensitive axes of *Camellia sinensis* in relation to dehydration, freezing rate and the thermal properties of tissue water. *Journal of Plant Physiology* 140: 596- 604.
- Zavaleta-Mancera H A, E M Engleman (1991)** Anatomía de *Casimiroa edulis* (Rutaceae) “zapote blanco”, durante su desarrollo. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 51: 53-65.

**V. ACUMULACIÓN DE AZÚCARES EN SEMILLAS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.)
DE TRES ORÍGENES GENÉTICOS Y SU RELACIÓN CON TOLERANCIA A LA
DESECACIÓN**

**SUGAR ACCUMULATION IN COCOA SEEDS (*Theobroma cacao* L.) FROM TREE
GENETIC ORIGINS AND ITS RELATIONSHIP WITH DESICCATION TOLERANCE**

**Rangel Fajardo Ma. Alma¹, Delgado Alvarado Adriana^{2*}, Córdova Téllez Leobigildo¹,
Zavaleta Mancera Hilda Araceli³, Villegas Monter Ángel¹, López Andrade Alejandro
Procopio⁴, Ignacio Vidales Fernández⁵**

RESUMEN

La principal característica de las semillas recalcitrantes, es la sensibilidad a la desecación; sin embargo, pueden presentar diferencias en el grado de sensibilidad, que está condicionado a factores propios de herencia de la planta madre, ambientales y parámetros fisiológicos y bioquímicos como la presencia de oligosacáridos. En el presente trabajo se evaluó la sensibilidad a la desecación en diferentes genotipos de cacao y se cuantificaron las concentraciones de oligosacáridos relacionados con la tolerancia a desecación. Mazorcas de Pound 7 (Forastero), UF668 (Trinitario) y Carmelo (Criollo) fueron cosechadas a los 5, 6 y 7 meses después de floración. Las semillas se secaron a 300 g H₂O·kg⁻¹ pf, usando como testigo semillas recién extraídas, la sensibilidad a desecación se midió mediante germinación y se cuantificaron oligosacáridos en eje embrionario y cotiledones de semillas con 646 g H₂O·kg⁻¹ pf de agua en promedio y de 300 g H₂O·kg⁻¹ pf, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. La

¹ Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Orientación Producción de semillas. Km 36.5 Carretera México-Texcoco.

² Colegio de Postgraduados. Campus Puebla. Autor correspondiente: adah@colpos.mx

³ Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Instituto de Recursos Naturales. Orientación Botánica.

⁴ Instituto de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Huimanguillo. Tab.

⁵ Instituto de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Uruapan. Mich

germinación inicial alcanzó 93 % y disminuyó en promedio 50 % con contenido de agua de 300 g H₂O•kg⁻¹ pf. Las proporciones de rafinosa:sacarosa presentan diferencias donde sobresale el genotipo UF668 y la segunda cosecha (6 mdf) con 0.25 y 0.28 proporciones que se relacionan directamente con los mayores porcentajes de germinación. La propoción de rafinosa:sacarosa influye en la sensibilidad a la desecación.

Palabras clave: *Theobroma cacao* L., desecación, estaquiosa, rafinosa, sacarosa, semilla.

ABSTRACT

The main characteristic of the recalcitrant seeds, like *Theobroma cacao* L, is sensitivity to the drying, nevertheless, can display differences in the sensitivity degree, which is conditioned by factors of the mother plant's inheritance, environmental, and parameters physiological and biochemical parameters such as the presence of oligosaccharides. In the present work was evaluated the sensitivity to drying in different genotypes of cacao and the oligosaccharides concentrations of related to desiccation tolerance were evaluated. Ears of Pound 7 (Forastero), UF668 (Trinitario) and Carmelo (Criollo) were harvested to 5, 6 and 7 months after flowering. The seeds were dried to 300 g H₂O•kg⁻¹ pf, using as control a sample of seeds just remove, sensitivity to drying was measured by germination and oligosaccharides were quantified in embryonic axis of cacao and cotyledons of seeds with harvest humidity and 300 g H₂O•kg⁻¹ pf through high permormance liquid chromatography. The germination with harvest humidity reached 93% which drop in average 50% with moisture content of 300 g H₂O•kg⁻¹ pf. The proportions of raffinose: saccharose rates displays differences where the UF668 genotype outstands with a proportion of 0.25 and the second harvest (6 mdf) do 0.28, rates that are directly related to the higher germination percentages. The raffinose: sucrose rates has influences in the sensitivity to desiccation.

Key words: Theobroma cacao L., drying, raffinose, saccharose, seed, stachyose

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las semillas de las angiospermas adquieren la habilidad para tolerar fuertes reducciones de humedad al final de su desarrollo, lo que les permite mantener la viabilidad por periodos prolongados y el embrión quiescente (Bewley, 1995). Con base a la tolerancia a la desecación las semillas han sido clasificadas en ortodoxas, recalcitrantes e intermedias (Roberts, 1973). Las ortodoxas toleran entre 5 y 3% de deshidratación, las intermedias entre 10 y 12.5 % y las recalcitrantes de 15 a 50 % (Farrant *et al.*, 1993; Gentil, 2001).

La habilidad de las semillas para sobrevivir a la deshidratación depende de diversos mecanismos de adaptación que previenen el deterioro celular durante la pérdida de agua. En semillas ortodoxas, la maduración y la adquisición de tolerancia a la deshidratación pueden estar relacionadas con la acumulación de azúcares, proteínas, lípidos y otras compuestos compatibles (Blackman *et al.*, 1992). La acumulación de trehalosa y sacarosa (disacáridos) y rafinosa (oligosacárido) se ha asociado con la estabilización de las membranas (Buitink *et al.*, 2000) y la vitrificación (formación de cristales) celular durante el secado de la semilla (Blackman *et al.*, 1992; Sun *et al.*, 1994). Altas concentraciones de oligosacáridos y la formación de la fase vítrea viscosa demora la cristalización de solutos, inhibe la movilidad molecular y restringe las reacciones bioquímicas (Koster, 1991), previniendo así el deterioro de estructuras macromoleculares durante la deshidratación.

En semillas recalcitrantes se ha encontrado que la concentración de algunos azúcares, especialmente monosacáridos como glucosa, fructosa y galactosa, puede superar a las reportadas en semillas ortodoxas (Farnsworth, 2000; Steadman *et al.*, 1996); como en el caso de *Landolphia kirkii* Dyer (Berjak *et al.*, 1992) y *Avecina marina* L. (Farrant *et al.*, 1993). Se ha documentado

que dichos azúcares están involucrados como promotores de los productos de la reacción de Maillard (Koster y Leopold, 1988), que estimulan la respiración y favorecen la formación de radicales libres (Leprince *et al.*, 1995). Además, la presencia de estos azúcares en altas concentraciones en los tejidos tienden a favorecer la sensibilidad a la desecación (Koster y Leopold, 1988, Hoekstra *et al.*, 1994). Por otro lado, se ha indicado que en semillas recalcitrantes no solo la presencia de azúcares específicos, tales como la rafinosa en proporción con la sacarosa, son suficientes para presentar baja sensibilidad a la desecación (Koster y Leopold, 1988, Bruni y Leopold, 1991) y aunque correlacionen en algunos sistemas los mecanismos de protección aun no son entendidos por completo. En el presente trabajo se cuantificó la acumulación de azúcares en semillas de tres poblaciones de cacao y se determinó la relación de estos con el grado de tolerancia a la desecación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon mazorcas de tres clones de cacao de tres orígenes genéticos: (1) criollo Carmelo, material endémico producto de la selección de los agricultores; (2) forastero: Pound 7 Origen Peruano (seleccionó J. F. POUND en 1938) y (3) trinitario: híbrido UF668, material originario de Costa Rica (seleccionados por UNITED FRUIT CO.). Todos los materiales están resguardados en el banco de germoplasma (plantación en campo) del INIFAP, localizado en el Km 1 de la carretera Huimanguillo-Cárdenas, Tab.

Se cosecharon mazorcas de aproximadamente 5, 6 y 7 meses después de la floración, como indicadores se consideraron el color, tamaño y número de días después de floración. Las mazorcas se lavaron y desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% por 1 h. En seguida las semillas se extrajeron y se lavaron con abundante agua hasta retirar el mucílago.

En cada cosecha, una vez que las semillas de los genotipos fueron lavadas se sometieron a secado, extendiéndolas en toallas de papel (Marquis Georgia-Pacific) en condiciones de laboratorio, entre 20 y 26 °C y 70 a 75 % de humedad relativa. Se monitoreó la reducción de agua para obtener muestras de semillas con 300 g H₂O·kg⁻¹pf, teniendo como testigo, las semillas con contenido de agua al momento de cosecha (que fluctuó entre 763 y 580 g H₂O·kg⁻¹pf); el agua en semillas se determinó de acuerdo a Changrun y Sun (1999). De cada cosecha y nivel de humedad se tomó una muestra de 10 semillas, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -40°C para determinar los cambios en la acumulación de azúcares.

Extracción de azúcares. Se efectuó en 50 y 250 mg de tejido del eje embrionario y cotiledones, respectivamente, de la combinación de tratamientos, cosechas, genotipos y nivel de secado. Como referencia de los niveles de acumulación de dichos azúcares en las semillas del tipo ortodoxas, se utilizaron semillas de maíz del híbrido HS2, de las cuales se extrajo el eje hipocótilo radicular y el escutelo. El tejido se colocó en tubos de 15 mL a los que se agregaron 15 mL de metanol al 80 % (v/v), se pusieron en ebullición a 37 °C por 10 min tres veces. En seguida se obtuvo el sobrenadante al que se adicionó 100 µL de manitol como estándar interno y los tubos se agitaron en agitador de acción orbital a 300 rpm por 20 min, para posteriormente centrifugarlos a 3000 rpm a 4 °C por 10 min. Se separó el sobrenadante y el residuo sólido se lavó dos veces con 1 mL de etanol al 80 % (v/v) y se desechó, conservando el etanol de los lavados. Se tomó una alícuota de 5 mL y se adicionaron 3 mL de cloroformo, se agitó y centrifugó a 2000 rpm a 4 °C por 3 min. Se separó la fase acuosa y se le adicionó 50 mg de Polivinilpolipirrolidona (PVPP, Sigma) y se centrifugó por 10 min a 3000 rpm a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante, se agregó 1 mL de agua destilada y se volvió a centrifugar, rescatando el sobrenadante. Los extractos obtenidos se llevaron a sequedad en rotavapor (R-114

Büchi, Switzerland) a 37 °C. Los residuos fueron resuspendidos con 1 mL de agua destilada y filtrados en columnas de 5 mL que contenían 2 mL de resina Dowex-1 y 3 mL de Dowex-50; el extracto obtenido se almacenó en tubos eppendorf de 2 mL a -20°C hasta su análisis.

Cuantificación de azúcares. Los extractos se analizaron en cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR, HP 1100, Hewlett Packard), con columna Supelcogel Ca (Supelco 59305-U 30 cm x 7.8 mm, 9 µm) y columna Aminex (HPX-87C, 300 mm x 7.8 mm, 5µm, Bio-Rad, 417467) con fase móvil de agua deionizada (18 mohm) y flujo de 0.6 mL·min⁻¹ y detector de índice de refracción. El volumen de inyección fue de 20 µL con tiempo de análisis por muestra de 30 min.

La concentración de azúcares de las muestras se determinó con las curvas patrón que se prepararon con soluciones estándar de 0, 50, 100 y 150 mg mL⁻¹ de rafinosa, estaquiosa, sacarosa, glucosa, fructosa, arabinosa, sorbitol, galactosa y manitol (Todos marca SIGMA).

Acumulación de azúcares y su relación con tolerancia a la desecación. La tolerancia a la desecación fue evaluada en el capítulo anterior; sin embargo, será necesario retomar algunos aspectos para poder tener un panorama claro de la relación de los azúcares con la tolerancia a la desecación. La sensibilidad fue medida con base en pruebas de germinación en las semillas con contenido de agua al momento de extracción del fruto y después de secado a 300 g H₂O·kg⁻¹ pf en cada tratamiento, en muestras de 60 semillas repartidas en cuatro repeticiones de 15, colocadas entre toallas de papel de 24 x 23.5 cm (Marquis Georgia-Pacific) humedecidas con agua destilada. Éstas se enrollaron en forma de taco y se colocaron en cámara de germinación a 30 ± 1 °C (Mumford y Brett, 1982). El primer conteo se efectuó a los tres días y el segundo a los siete días después de la siembra, se consideraron semillas germinadas aquellas con protrusión radicular (King y Roberts, 1982).

La acumulación de azúcares se expresan en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ pf y todas las muestras fueron estandarizadas en su peso a $300 \text{ gH}_2\text{O kg}^{-1}\text{pf}$ mediante la ecuación propuesta por Moreno (1996). Los datos se sometieron a análisis de varianza con el paquete estadístico SAS para Windows 6.12, mediante un modelo completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos y en los factores que manifestaron diferencia significativa se realizó la comparación de medias con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

RESULTADOS

Acumulación de azúcares

La acumulación de azúcares de los grupos monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos en las semilla de cacao está en función del grado de madurez, genotipo, nivel de secado y tejido de la semilla, así como su interacción (Cuadro 1). En cuanto a cosecha, la acumulación de estaquiosa y rafinosa mostraron incrementos y decrementos durante el periodo de evaluación, con máximo de 9.9 y 0.27 $\text{mg g}^{-1}\text{pf}$ al cosechar 5 y 6 meses después de floración (mdf), respectivamente. La acumulación máxima de sacarosa (1.25 $\text{mg g}^{-1}\text{pf}$) ocurrió 5 mdf, mientras que los monosacáridos se alcanzó 7 mdf, que fluctuó entre 0.13 y 1.49 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$, excepto manosa que mostró una reducción de hasta 0.37 mg g^{-1} pf con la maduración de la semilla. El genotipo UF668 acumuló 47.8 y 66.1 % mayor concentración de estaquiosa y 29.63 y 70.4 % mas rafinosa que Pound 7 y Carmelo, respectivamente. No obstante, Pound 7 acumuló 2.3 y 53.5 % más sacarosa que UF668 y Carmelo. La acumulación de monosacáridos mostró variación entre genotipos, UF668 sobresalió en la acumulación de manitol, Pound 7 en fructosa y sorbitol y Carmelo en glucosa. No se encontró diferencia significativa entre los genotipos para los monosacáridos galactosa y arabinosa. El efecto de la reducción de agua de 646 (promedio) a $300 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1}$ pf se manifestó con decrementos en 37, 5.6 y 3.7 % en la acumulación de estaquiosa, rafinosa y

sacarosa, respectivamente, mientras que galactosa, manitol y sorbitol se incrementaron 51, 24 y 25.6 %. No se detectaron cambios significativos en la acumulación de glucosa, fructosa y arabinosa por el secado de la semilla (Cuadro 1). La acumulación de los azúcares también está en función del tejido de la semilla, el eje embrionario superó al cotiledón en 18.5, 70.4, 54.8, 56.5, 80 y 43.8 % en estaquiosa, rafinosa, sacarosa, glucosa, manosa y sorbitol, respectivamente, mientras que galactosa, fructosa y arabinosa no difieren significativamente en ambos tejidos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Promedios de los azúcares evaluados en semillas de cacao, resultado de los principales factores de variación.

Factor	Azúcares evaluados ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$)								
	Oligosacáridos		Disacáridos	Monosacáridos					
	Est	Raf	Sac	Glu	Gal	Fru	Ara	Man	Sor
Cosecha									
(mdf)									
5	9.9 a	0.07 c	1.25 a	0.37 b	0.13 b	0.04 b	0.13 b	1.31 a	0.31 b
6	9.31 a	0.27 a	0.76 c	0.46 b	0.17 b	0.03 b	0.09 b	0.75 c	0.28 b
7	6.39 b	0.19 b	1.17 b	1.49 a	0.51 a	0.13 a	0.21 a	0.94 b	0.52 a
DMS	2.12	0.02	0.06	0.14	0.27	0.04	0.08	0.16	0.1
Genotipo									
UF668	13.8 a	0.27 a	1.27 a	0.81 b	0.21 a	0.04 b	0.11 a	1.30 a	0.32 b
Pound 7	7.21 b	0.19 b	1.30 a	0.44 c	0.40 a	0.08 a	0.13 a	1.17 a	0.48 a
Carmelo	4.68 c	0.08 c	0.59 b	1.08 a	0.22 a	0.07 ab	0.18 a	0.52 b	0.31 b
DMS	1.45	0.02	0.06	0.14	0.27	0.04	0.08	0.16	0.1
Secado									
Inicial	10.5 a	0.18 a	1.08 a	0.77 a	0.18 b	0.08 a	0.16 a	0.86 b	0.32 b
300	6.61 b	0.17 b	1.04 b	0.77 a	0.37 a	0.06 a	0.13 a	1.13 a	0.43 a
DMS	1.45	0.009	0.04	0.096	0.19	0.03	0.05	0.11	0.07
Tejido									
Eje	9.43 a	0.27 a	1.46 a	1.08 a	0.29 a	0.07 a	0.15 a	1.66 a	0.48 a
Cotiledón	7.69 b	0.08 b	0.66 b	0.47 b	0.26 a	0.06 a	0.13 a	0.33 b	0.27 b
DMS	1.45	0.009	0.04	0.096	0.19	0.03	0.05	0.11	0.07
Maíz									
Eje	3.39	0.47	8.29	0.54	0.16	ND	0.04	1.88	0.07
Escutelo	ND	0.49	2.89	0.60	0.07	ND	ND	0.44	0.05

Medias con la misma letra en cada variable y para cada factor, no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). mdf: meses después de floración. Est: estaquiosa, Raf: rafinosa, Sac: sacarosa, Glu: glucosa, Gal: galactosa, Fru: fructosa, Ara: arabinosa, Man.: manitol, Sor: sorbitol.

Los factores cosecha, genotipo y secado ejercieron efecto interactivo en la acumulación de los azúcares evaluados, pero en la mayoría de los casos no se detectaron tendencias evidentes, por lo que las interacciones que se discutirán en este apartado serán de los azúcares que mostraron mayores diferencias. En la interacción cosecha por genotipo (Figura 1), UF668 mantuvo mayor acumulación de estaquiosa en las tres cosechas, comparado con Pound 7 y Carmelo, pero no existe un patrón definido en función del avance en el grado de madurez, pues mientras Pound 7 tendió a incrementar la concentración de este azúcar en UF668 y Carmelo disminuyó (Figura 1 A). Los genotipos UF668 y Carmelo alcanzaron mayor acumulación de rafinosa al cosechar 6 mdf, pero UF668 superó en 61 y 62 % a Pound 7 y Carmelo (Figura 1 B). En UF668 la concentración de sacarosa y glucosa incrementó conforme la semilla fue cosechada con mayor madurez, mientras que Pound 7 y Carmelo manifestaron descenso a los 6 meses en ambos azúcares, pero se incrementó a los 7 mdf, particularmente Carmelo en 84.6 y 44.5 % respecto a Pound 7 y UF668 (Figura 1 C y D).

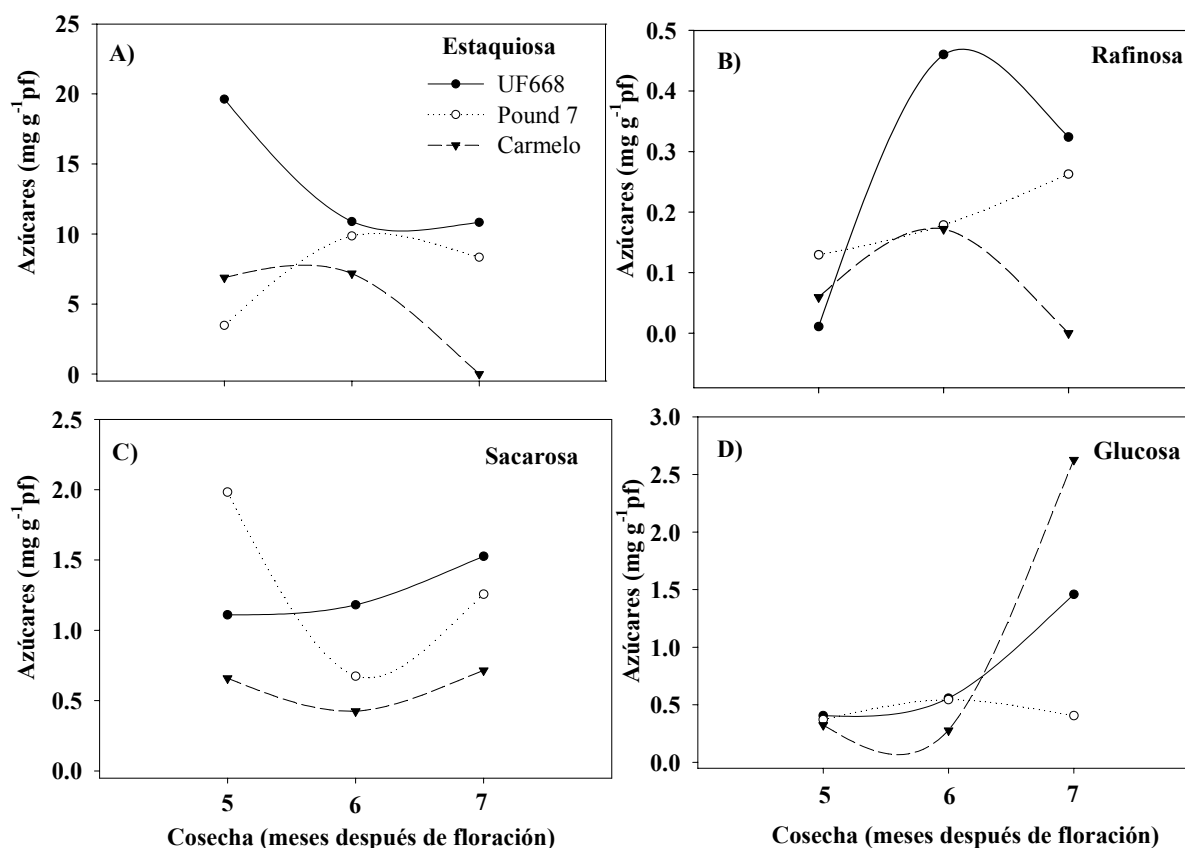


Figura 1. Acumulación de A) estaquirosa, B) rafinosa, C) sacarosa y D) glucosa en semillas de cacao, resultante de la interacción cosechas por genotipo.

En la interacción cosecha por secado resultó evidente la reducción en la concentración de estaquirosa y rafinosa al disminuir el contenido de agua a 300 g H₂O kg⁻¹ pf, sobretodo al cosechar 6 y 7 mdf (Figura 2 A y B): Las reducciones más prominentes se obtuvieron 6 mdf, donde los oligosacáridos estaquirosa y rafinosa disminuyeron 74.2 y 55.3 %, respectivamente. Sacarosa y glucosa se redujeron hasta 50.7 y 37.7 % respectivamente por efecto del secado, (Figura 2 C y D).

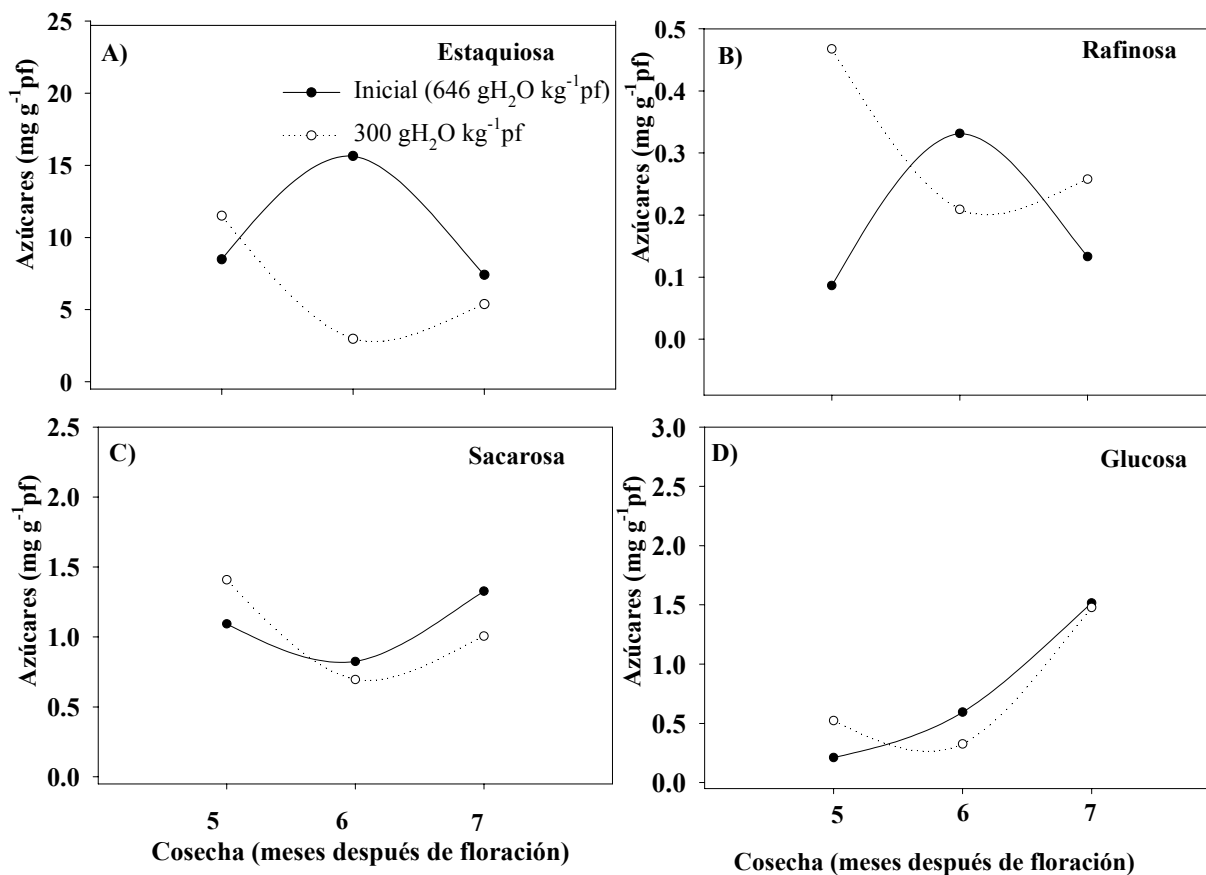


Figura 2. Acumulación de A) estaquirosa, B) rafinosa, C) sacarosa y D) glucosa en semillas de cacao, resultante de la interacción cosechas por secado.

En la interacción genotipo por secado, Carmelo no registró cambio significativo en estaquirosa, en Pound 7 se incrementó 4.47 %, mientras que en UF668 se redujo 60 % al disminuir el contenido de agua a 300 H₂O kg⁻¹ pf (Figura 3 A). La concentración de rafinosa incrementó con el secado 19 % para UF668, mientras que en Pound y Carmelo se redujo 9 y 65 % (Figura 3 B). Los genotipos UF668 y Carmelo mostraron reducción de 20 y 42% en sacarosa, pero glucosa se incrementó 35 % en Carmelo y se disminuyó 45 % en UF668, no se detectaron cambios marcados en la mayoría de estos azúcares en Pound 7, excepto en sacarosa, que incrementó 30.33 % con el secado (Figura 3 C y D).

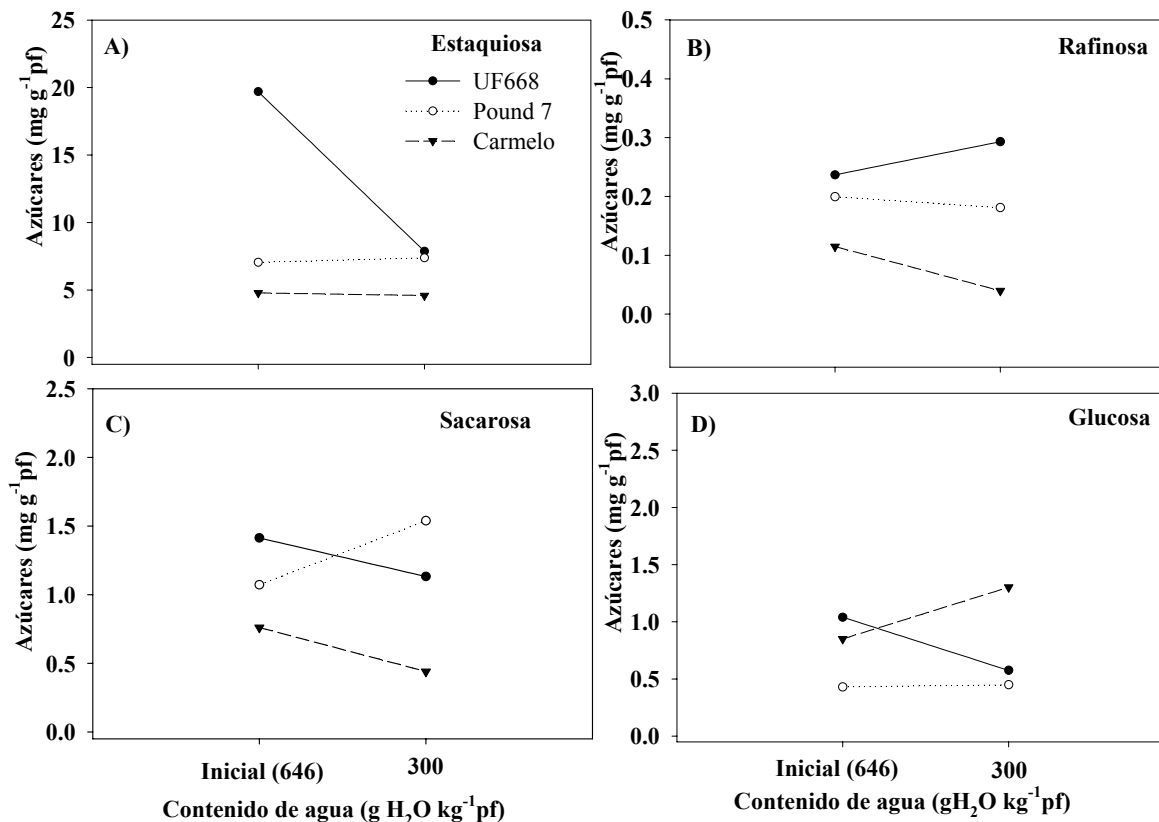


Figura 3. Acumulación de A) estaquiosa, B) rafinosa, C) sacarosa y D) glucosa en semillas de cacao, resultante de la interacción genotipo por secado.

La acumulación de algunos azúcares evaluados en el presente estudio se han determinado en semillas ortodoxas, intermedias y recalcitrantes. La acumulación de sacarosa, estaquiosa y rafinosa se incrementa considerablemente en semillas ortodoxas al final de la etapa de acumulación de reservas y se ha asociado con la adquisición de la tolerancia a la desecación, lo que se discutirá en el siguiente apartado. Bucheli *et al.* (2001) detectaron la presencia de rafinosa y estaquiosa en el eje embrionario de dos clones de cacao, en los que se cuantificó el máximo a los 4 y 5 mdf. Esta fluctuación en la acumulación fue detectada en el presente estudio; además, la acumulación de estaquiosa fue 97 % superior a rafinosa, lo que no concuerda con lo reportado por Steadman *et al.* (1996), quienes encontraron valores hasta de 13.4 mg g⁻¹ ps para rafinosa y 56.2 mg g⁻¹ ps para sacarosa, lo que podría deberse a la técnica utilizada. La mayoría de los

monosacáridos alcanzaron su máxima acumulación 7 mdf, lo que coincide con la tendencia en la acumulación de peso seco observada en el presente estudio (datos mostrados en el capítulo IV).

La diferencia en la acumulación de azúcares entre genotipos se ha reportado por varios autores (Dussert *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 2000), pero son pocos los trabajos realizados para evaluar la diferencias intraespecíficas; en este sentido, el presente estudio demuestra las diferencias en la acumulación de azúcares en genotipos de la misma especie, UF668 supera a los otros genotipos, sobretodo en oligosacáridos y disacáridos, azúcares asociados con la tolerancia a la desecación. La mayor acumulación de estos azúcares en el eje comparado con los cotiledones, coincide con lo reportado por Steadman *et al.* (1996).

En las especies del tipo ortodoxas como *Acer platanoides* L. la concentración de estaquiosa, rafinosa y sacarosa se incrementó al reducir el contenido de agua de 520 g H₂O·k⁻¹ pf a 70 g H₂O·k⁻¹ pf (Hong *et al.*, 2000), caso contrario a lo que ocurrió con estos azúcares en el presente estudio donde la concentración disminuyó 37 % para estaquiosa, 5.6 % para rafinosa y 3.7 % en sacarosa, asociado posiblemente al comportamiento recalcitrante que presentan las semillas de la especie en estudio.

Acumulación de azúcares y tolerancia a la desecación

La sensibilidad a la desecación se cuantificó por medio de la respuesta a la germinación después de reducir el contenido de agua de la semilla a 300 gH₂O kg⁻¹pf. El grado de madurez influyó en la sensibilidad a la desecación, manifestando mayor tolerancia al cosechar la semilla 6 mdf, donde la germinación se mantuvo hasta 30 % superior a las otras cosechas (Cuadro 2). Los genotipos UF668 y Pound 7 resultaron menos sensibles a la desecación, al mantener hasta 30 % más de germinación que Carmelo, el genotipo más sensible. Por otro lado, el secado causó reducción de 59 % en la germinación, (Cuadro 2).

Cuadro 2. Factores simples analizados para la variable germinación y proporciones de rafinosa:sacarosa en semillas de cacao.

Factores	Germinación (%)	Rafinosa: sacarosa
Cosecha (mdf)		
	5	56 b
	6	83 a
	7	50 b
DMS	7.29	0.156 b
Genotipo		
UF668 (Trinitario)	74 a	0.055c
Pound 7 (Forastero)	71 a	0.282 a
Carmelo (Criollo)	44 b	0.156 b
DMS	7.29	0.021 c
Secado		
Inicial (646 g H ₂ O·kg ⁻¹ pf)	93 a	0.017
300 g H ₂ O·kg ⁻¹ pf	34 b	0.251 a
DMS	4.95	0.221 b
		0.012

Medias con la misma letra en cada variable y para cada factor, no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). mdf: meses después de floración.

DISCUSIÓN

El papel que juegan los azúcares en la tolerancia o sensibilidad a la desecación ha sido ampliamente discutido por varios autores. Se ha documentado que los oligosacáridos (estaquiosa y rafinosa) y disacáridos (sacarosa) son esenciales para la vitrificación del citoplasma celular, que evita daños en las paredes celulares, debido no tanto a la presencia de un azúcar particular sino a la proporción que se encuentre de ellos (Brenac *et al.*, 1997). En el presente estudio, resultó evidente que la máxima acumulación de rafinosa en la cosecha 6 mdf coincide con la mayor germinación; de igual forma, la mayor acumulación de estaquiosa, rafinosa y sacarosa concuerda con la máxima germinación de UF688. El hecho de que la mayor germinación observada previo a la reducción de agua en la semilla, muestra el papel que se le ha propuesto a estos azúcares en la tolerancia a la desecación. Por otro lado, resultó evidente que no existe relación en la

acumulación de azúcares (monosacáridos) con la tolerancia a la desecación detectada al secar a $300 \text{ gH}_2\text{O kg}^{-1}$ pf las semillas de los tres orígenes genéticos de cacao. Algunos estudios realizados en semillas recalcitrantes han demostrado que las concentraciones de azúcares pueden superar a las reportadas en semillas ortodoxas (Farnsworth, 2000, Steadman, 1996), por lo que se ha cuestionado el papel de estos en la tolerancia a la desecación; por tal razón, Koster y Leopold, (1988) y Kuo *et al.* (1988), señalan que la relación rafinosa:sacarosa correlaciona positivamente con la tolerancia a la desecación. En el presente estudio, resulta claro que la semilla cosechada 6 mdf superó a las cosechas 5 y 7 mdf con 80.5 y 44.7 % en la relación rafinosa:sacarosa y concomitantemente es la cosecha que mostró mayor germinación. De igual manera, UF668 supera a Pound 7 y a Carmelo en 12 y 92 % en esa relación y en germinación, respectivamente (Cuadro 2). Asimismo, la mayor relación rafinosa:sacarosa obtenida previo al secado coincide con la máxima germinación. Estos resultados corroboran el papel de la relación rafinosa:sacarosa en la tolerancia a la desecación; no obstante, los niveles de acumulación de manera individual son bajos, comparados con los resultados obtenidos en el eje de maíz que supera a UF668 en 43 % para rafinosa y en 84 % para sacarosa (Cuadro 1), lo que corrobora que la acumulación de estos azúcares son importantes para soportar el grado de desecación característico de este grupo. Los resultados del presente estudio confirman la existencia de diferencias en el grado de sensibilidad a la desecación entre individuos de la misma especie, tal como lo señalan Berjark y Pammenter (2000).

Se ha encontrado que la relación oligosacaridos:sacarosa es de 1.04 en frijol (Bailly *et al.*, 2001), 0.6 en trigo (Black *et al.*, 1996) y 1.0 en chicharo (Corbineau *et al.*, 2000). Sin embargo, autores como Bruni y Leopold (1992) y Sun *et al.* (1994) coinciden en que la presencia de estos azúcares no es suficiente para proporcionar la tolerancia a desecación en semillas recalcitrantes y que los mecanismos de protección aun no son del todo claros. Bailly *et al.* (2001) indican que la

proporción de oligosacáridos:sacarosa registra alta correlación con la tolerancia a la desecación en frijol, caso contrario ocurrió con lo descrito por Lin y Huang (1994), quienes al analizar los contenidos de azúcares en 11 especies recalcitrantes, concluyen que las concentraciones de oligosacáridos y las proporciones con sacarosa no son determinantes en la sensibilidad a la desecación de estas semillas. Con base en los resultados del presente estudio, se puede señalar que tanto la cantidad como la relación de algunos azúcares como rafinosa:sacarosa pueden estar involucrados en la tolerancia a la desecación.

CONCLUSIONES

La acumulación de azúcares fluctuó en las tres cosechas evaluadas, con mayores concentraciones en los genotipos UF668 y Pound 7. El secado causó reducción en la acumulación de azúcares, principalmente, rafinosa, estaquiosa y sacarosa. Las mayores concentración de rafinosa, estaquiosa y sacarosa, así como la mayor relación rafinosa:sacarosa coinciden con la menor sensibilidad a la desecación y germinación, encontrada en la cosecha 6 mdf, genotipo UF668 y previo al secado. No se detecto relación de la sensibilidad a la desecación con la acumulación de los monosacáridos evaluados.

LITERATURA CITADA

Bailly C, C Audigier, F Ladonne, M H Wagner, F Coste, F Corbineau, D Côme (2001)

Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *Journal of Experimental Botany* 52: 701-708.

Berjak P, C W Vertucci, N W Pammenter (1992) Homoiohydrous (recalcitrant) seeds:

developmental status, desiccation sensitivity and the state of water in axes of *Landolphia kirkii* Dyer. *Planta* 186:249-261

- Berjak, P, N M Pammenter (2000)** What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12: 22-55
- Bewley J D (1995)** Physiological aspects of desiccation tolerance. A retrospect. *Journal of Plant Science* 156: 393-403
- Black M, F Corbineau, M Grzesik, P Guy, D Come (1996)** Carbohydrate metabolism in of developing and maturing wheat embryo in relation to its desiccation tolerance. *Journal Experimental Botany* 47:161-169
- Blackman S A, R L Obendorf, A C Leopold (1992)** Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. *Plant Physiology* 100:223-230
- Brenac P, M Horbowicz, S M Downer, A M Dickerman, M E Smith, R L Obendorf (1997)** Raffinose Accumulation Related to desiccation tolerance during maize (*Zea mays* L.) seed development and maturation. *Journal Plant Physiology* 150: 481-488
- Bruni F, A C Leopold (1991)** Glass transitions in soybean seed: relevance to anhydrous biology. *Plant Physiology* 100: 225-230
- Bruni F, A C Leopold (1992)** Pools of water in anhydrobiotic organisms. A thermally stimulated depolarisation current study. *Biophysical Journal* 63: 633-672
- Bucheli P, G Rousseau, M Alvarez, M Laloi, J McCarthy (2001)** Developmental variation of sugars, carboxylic acids, purine alkaloids, fatty acids and endoproteinase activity during maturation of *Theobroma cacao* L. seeds. *Journal Agriculture Chemistry* 49: 5046-5051
- Buitink J, M Hemminga, F Hoekstra (2000)** Is there a role for oligosaccharides in seed longevity? An assessment of intracellular glass stability. *Plant Physiology* 122:1217-1224

- Changrun L, Q Sun Wendel (1999)** Desiccation sensitivity and activities of free radical-scavenging enzymes in recalcitrant *Theobroma cacao* seeds. Seed Science Research 9:209-217.
- Corbineau F, M A Picard, J A Fougereux, F Ladonne, D Côme (2000)** Effects of dehydration conditions on desiccation tolerance of developing pea seeds as related to oligosaccharide content and cell membrane proprieties. Seed Science Research 10: 329-339.
- Dussert S, N Chabrillange, F Engelmann, F Anthony, J Louarn, S Hamon (1998)** Cryopreservation of seeds of four coffee species (*Coffea Arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. Seed Science Research 8: 9:15.
- Farnsworth E (2000)** The ecology and physiology of viviparous and recalcitrant seeds. Annual Review of Ecology and Systematics 31:107-138
- Farrant M J, W N Pammenter, P Berjak (1993)** Seed development in relation to desiccation tolerance: A comparison between desiccation-sensitive (recalcitrant) seed of *Avicennia marina* and desiccation tolerant types. Seed Science Research 3: 1-13.
- Gentil D F O (2001)** Conservação de sementes do cafeeiro: resultados discordantes ou complementares? Bragantia 60: 149-154
- Hoekstra F A, A M Haigh, A A F Tetteroo, T Van Roekel (1994)** Changes in soluble sugar in relation to desiccation tolerance in cauliflower seeds. Seed Science Research 4:143-147

- Hong T D, A Gedebo, R H Ellis (2000)** Accumulation of sugars during the onset and development of desiccation tolerance in immature seeds of Norway maple (*Acer platanoides* L.) stored moist. *Seed Science Research* 10:147-152
- King W M, E H Roberts (1982)** The imbibed storage of cocoa (*Theobroma cacao* L) seeds. *Seed Science and Technology* 10: 535-540.
- Koster K L (1991)** Glass formation and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiology* 96: 302-304
- Koster L K, A C Leopold (1988)** Sugar and desiccation tolerance in seed. *Plant Physiology* 88: 829-832
- Kuo M T, F VanMiddlesworth, W J Wolf (1988)** Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. *Journal Agriculture Chemistry* 36: 32-36
- Leprince O, C W Wertucci, G A F Hendry, N M Atherton (1995)** The expression of desiccation-induced damage in orthodox seeds is a function of oxygen and temperature. *Physiologia Plantarum* 94: 233-240
- Lin P T, N H Huang (1994)** The relationship between carbohydrate composition of some tree seed and their longevity. *Journal of Experimental Botany* 45:1289-1294
- Moreno M E (1996)** Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Universidad Autónoma de México. México. D. F. 389 p.
- Mumford M P, C A Brett (1982)** Conservation of cacao seed. *Tropical Agriculture* 59: 306-310.
- Roberts E H (1973)** Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* 1: 499-514.
- Steadman K J, H W Pritchard, P M Dey (1996)** Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. *Annals of Botany* 77:667-674.

Sun W Q, T C Irving, A C Leopold (1994) The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. *Physiologia Plantarum* 90:621-628

VI. DISCUSIÓN GENERAL

Las semillas recalcitrantes presentan características anatómicas, fisiológicas y bioquímicas que les confieren ventajas o desventajas para sobrevivir a las adversidades ambientales. En los cortes anatómicos realizados en semillas de cacao se pudieron identificar algunas características anatómicas típicas de las éstas semillas: presencia de cubiertas duras en el fruto (mesocarpio y pericarpio) (Moreno *et al.*, 2006), cotiledones grandes con respecto la eje embrionario y endospermo líquido (Cuevas, 2004). Sin embargo, las cubiertas de las semillas son delgadas lo que puede favorecer la pérdida de agua y por lo tanto la viabilidad (Chacón y Bustamente, 2001) aunque presentan células especializadas que han sido relacionadas con la mixospermia (de Araújo y Bergemann, 1999). Estas semillas no toleran la desecación por debajo de $300 \text{ g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}\text{pf}$, pero suelen presentar diferencias en el grado de sensibilidad entre las poblaciones como ya se ha reportado para otras especies como *Coffea* (Dursset *et al.*, 1998) y *Dipterocarpus* (Tompsett, 1987). Dentro de las tres poblaciones analizadas, el material más sensible fue el criollo Carmelo, el cual redujo la germinación a cero con contenidos de agua en la semilla de $300 \text{ g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}\text{pf}$ mientras que los materiales Trinitarios y Forasteros en las mismas condiciones registraron germinación. En un análisis histológico de radículas (meristemo y caliptra) pudo observar cambios en la integridad morfológica de las células, desintegración de núcleos y colapso, características que pueden estar asociadas con daño en membranas, principal consecuencia de la pérdida de agua (Berjak y Pammenter 2000). Son varios los factores que se ven involucrados en la sensibilidad o tolerancia a la desecación, entre los más importantes se encuentran la presencia de proteínas LEA's, los niveles de ABA, la eficiencia de sistemas antioxidantes y con mayor énfasis la presencia de rafinosa y estaquiosa, que proporcionan estabilidad al citoplasma, y generan estabilidad en las estructuras de proteínas y ácidos nucleicos (ADN y ARN) (Leprince *et al.*, 1993, Vertucci *et al.*, 1995; Bewley, 1995; Leprince *et al.*, 1998, Pammenter *et al.* 1999,

Bryant *et al.*, 2001;) Esto motivo a realizar cuantificaciones de monosacáridos y oligosacáridos en las semillas sometidas a secado y compararlas con las semillas con contenido de agua inicial. Los contenidos de rafinosa y estaquiosa presentaron diferencias en genotipo (UF668, Pound 7 y Carmelo), fecha de cosecha (5, 6 y 7 meses después de floración), secado (contenido de agua inicial en la cosecha y $300 \text{ g H}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}\text{pf}$) y tejido (eje embrionario y embrión); sin embargo, las concentraciones de estos son diferentes a las reportadas para semillas ortodoxas (Steadman *et al.*, 1996), pero las relaciones más alta de rafinosa:sacarosa coincidieron con los máximos porcentajes de germinación para el genotipo UF668 y en las cosecha 6 mdf. Desafortunadamente las proporciones son inferiores de 0.28 a las reportadas para maíz (0.46) y frijol (Bailly *et al.*, 2001), trigo (0.6) (Black *et al.*, 1996) y chicharo (1.0) (Corbineau *et al.*, 2000), lo que indica que esta relación debe jugar un papel importante en la protección de las estructuras celulares, pero es diferente dependiendo del género y especie.

Existen más factores involucrados que trabajan en conjunto para proporcionar la estabilidad necesaria a toda la maquinaria celular y tolerar la desecación, por lo que sería necesario analizar con detalle los niveles de ABA y la eficiencia de sistemas antioxidante en especies recalcitrantes, intermedias y entre las especies de cada grupo.

LITERATURA CITADA

Bailly C, C Audigier, F Ladonne, M H Wagner, F Coste, F Corbineau, D Côme (2001)

Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *Journal of Experimental Botany* 52: 701-708.

Berjak P, N M Pammenter (2000) What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds.

Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 12: 22-55.

- Bewley D J (1995)** Physiological aspects of desiccation tolerance. A retrospect. *Journal of Plant Science* 156: 393–403.
- Black M, F Corbineau, M Grzesik, P Guy, D Come (1996)** Carbohydrate metabolism in the developing and maturing wheat embryo in relation to its desiccation tolerance. *Journal Experimental Botany* 47:161-169
- Bryant G., L K Koster., J Wolfe (2001)** Membrane behavior in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes. *Seed Science Research* 11: 17-25.
- Chacón P, R O Bustamente (2001)** The effects of seed size and pericarp on seedling recruitment and biomasa in *Cryptocarya alba* (Lauraceae) under two contrasting moisture regimes. *Vegetatio* 152: 137-144.
- Corbineau F, M A Picard, J A Fougereux, F Ladonne, D Côme (2000)** Effects of dehydration conditions on desiccation tolerance of developing pea seeds as related to oligosaccharide content and cell membrane proprieties. *Seed Science Research* 10: 329-339.
- Cuevas S A J (2004)** Semillas recalcitrantes: importancia, características y alternativas para su conservación. Publicaciones del Programa Nacional de Etnobotánica. Recursos naturales # 5 Séptima edición. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 14 p.
- De Araújo N C J, Bergemann de A I (1999)** Desarrollo ontogénico de plántulas de *Guazuma ulmifolia* (Sterculiaceae). *Revista de Biología Tropical* 47: 785-790

- Dussert S, N Chabrillange, F Engelmann, F Anthony, J Louarn, S Hamon (1998)** Cryopreservation of seeds of four coffee species (*Coffea Arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. *Seed Science Research* 8: 9:15.
- Leprince O, A F Hoekstra (1998)** The responses of cytochrome redox state and energy metabolism to dehydration support a role for cytoplasmic viscosity in desiccation tolerance. *Plant Physiology* 118: 1253-1264.
- Leprince O, G A F Hendry, B D McKersie (1993)** The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Science Research* 3: 231- 246.
- Moreno F, G Plaza, S Magnitskiy (2006)** Efecto de la testa sobre la germinación en la semilla de caucho (*Hevea brasiliensis* Muell.) *Agronomía Colombiana* 25: 290-295.
- Pammenter W N, P Berjak (1999)** A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research* 9: 13-37.
- Steadman K J, H W Pritchard, P M Dey (1996)** Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. *Annals of Botany* 77:667–674.
- Tompsett P B (1987)** Desiccation and storage studies on *Dipterocarpus* seeds. *Annals of Applied Biology* 110: 371-379.
- Vertucci W C, M J Farrant.(1995)** Acquisition and loss of desiccation tolerance.*In*: Seed development and germination. Kigel, J and Galili, G. (Eds). Editorial Marcel Dekker, New York. pp: 237-371.