UNIVERSIDAD PÚBLICA DE EL ALTO
ÁREA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS, PECUARIAS Y RECURSOS NATURALES
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TESIS DE GRADO

EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE SEMILLAS DE COPOAZÚ (*Theobroma grandiflorum*) MEDIANTE LA PRUEBA BIOQUÍMICA DEL TETRAZOLIO, EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Por:

Betzaida Churquina Cuevas

EL ALTO – BOLIVIA

Abril, 2024

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE EL ALTO
ÁREA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS, PECUARIAS Y RECURSOS NATURALES
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE SEMILLAS DE COPOAZÚ (*Theobroma grandiflorum*) MEDIANTE LA PRUEBA BIOQUÍMICA DEL TETRAZOLIO, EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Tesis de Grado presentado
como requisito para optar el Título de
Ingeniera Agrónoma

Betzaida Churquina Cuevas

Asesores:

Ing. Agr. Carlos Román Escobar .....

Ing. Agr. Soledad Lutino Flores .....

M. Sc. Lic. Ing. Ramiro Raúl Ochoa Torrez .....

Tribunal Revisor:

Lic. Ing. Rene Felipe Coronel Cortez .....

M.Sc. Lic. Ing. Luis Fernando Machicao Terrazas .....

M.Sc. Lic. Ing. José Luis Lima Jacopa .....

Aprobada

Presidente Tribunal Examinador .....

DEDICATORIA:

A Dios por guiarme siempre, brindarme buena salud y sabiduría para culminar mis estudios pese a los obstáculos que se fueron presentando.

A mi madre, Natividad Cuevas Mamani, quien fue el pilar fundamental, mi motivación, quien me apoyó día a día cada proceso de inicio a final en mi formación como profesional.

A mi padre Eloy Churquina Vargas, por apoyarme en parte de mi trabajo final.

A mi familia, quienes me apoyaron económica y emocionalmente en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por el privilegio de darme la vida y permitir haber terminado con éxito este trabajo.

A mi hermosa familia quienes me apoyaron en todo momento, alimentando la fuerza y ganas de cumplir una meta más en mi vida y formación profesional.

A la Universidad Pública de El Alto, casa superior de estudio quien me formó como profesional, brindando el conocimiento a través de los docentes calificados en bien de todos nosotros.

A la carrera de Ingeniería Agronómica por todo el conocimiento que me entregó, a sus autoridades, docentes que fuero parte de mi formación académica.

Al INAF (Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal) quien me acogió como pasante y tesista, por haberme brindado los ambientes y materiales para llevar a cabo la realización del trabajo de investigación.

A la Ing., Soledad Lutino Flores, por colaborarme en lo práctico y en la redacción del trabajo de investigación, no solo como tutora sino como amiga.

Al M.Sc. Lic. Ing. Ramiro Raul Ochoa, Ing. Carlos Roman por apoyarme como tutores en la realización del documento escrito.

Al Lic. Ing. Rene Felipe Coronel, M.Sc. Lic. Ing. Jose Luis Lima Jacopa, M.Sc. Lic. Ing. Luis Fernando Machicao Terrazas por hacerme las correcciones oportunas para obtener los resultados de un buen documento.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TEMAS i
ÍNDICE DE CUADROS vi
ÍNDICE DE FIGURA vii
ÍNDICE DE ANEXOS x
ABREVIATURAS xi
RESUMEN xii
ABSTRACT xiii

ÍNDICE DE TEMAS

1. INTRODUCCIÓN 1
1.1. Antecedentes 1
1.2. Planteamiento del problema 2
1.3. Justificación 3
1.4. Objetivos 3
1.4.1. Objetivo general 3
1.4.2. Objetivos específicos 3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 5
2.1. Cultivo de Copoazú 5
2.1.1. Taxonomía 5
2.1.2. Descripción botánica del Copoazú 5
2.1.3. Requerimientos edafoclimáticos 6
2.1.4. Fenología 6
2.1.5. Importancia del Copoazú en Bolivia 7
2.1.6. Variedades 7
2.1.7. Variedades comerciales 8

2.2. La semilla 8
2.2.1. Almacenamiento de las semillas 10
2.2.1.1. Conducta de almacenamiento de semillas ortodoxas 10
2.2.1.2. Conducta de almacenamiento de semillas recalcitrantes 10
2.2.1.3. Conducta de almacenamiento de semillas intermedias 11
2.2.2. Características y partes de las semillas tropicales 11
2.2.3. Semilla de Copoazú 11
2.2.3.1. Morfología de la semilla de Copoazú 12
2.2.4. Composición de la semilla de copoazú 13
2.2.5. Propagación del copoazú 14
2.3. Normas de calidad en semillas 14
2.3.1. Prueba de Germinación 15
2.3.2. Germinación 15
2.3.3. Porcentaje de germinación 15
2.3.4. Estructuras esenciales 15
2.3.5. Evaluación 16
2.3.6. Prueba de viabilidad 16
2.3.7. Pruebas de viabilidad con tetrazolio 17
2.3.8. Principio 17
2.3.8.1. Ventajas del ensayo topográfico 18
2.3.8.2. Desventajas del ensayo topográfico 18
2.3.9. Viabilidad 19
2.3.10. Procedimiento 19
2.3.11. Vigor 19
2.3.12. Pruebas de viabilidad con tetrazolio en otras especies 20
2.3.13. Patrones topográficos 20

3. MATERIALES Y MÉTODO 21
3.1. Localización 21
3.1.1. Ubicación Geográfica 21
3.2. Materiales 21
3.2.1. Material de escritorio 21
3.2.2. Material de laboratorio 22
3.2.3. Material químico 22
3.2.4. Equipos de laboratorio 22
3.2.5. Material biológico 23
3.3. Metodología 23
3.3.1. Desarrollo del ensayo 23
3.3.1.1. Medidas biométricas previos al ensayo (fruto, semilla y embrión) 23
3.3.1.2. Acondicionamiento del ambiente de la investigación 25
✓ Concentración de tetrazolio (Preparación de la solución) 26
3.3.1.3. Muestra de trabajo 28
➢ Obtención del fruto 29
3.3.1.4. Preparación de las semillas 29
3.3.1.5. Tinción o coloración 33
3.3.1.6. Germinación 33
3.3.1.7. Deterioro y pérdida de viabilidad 35
3.3.1.8. Mapa topográfico de viabilidad 35
3.3.1.9. Protocolo de viabilidad 36
3.3.2. Diseño experimental 36
3.3.2.1. Factores de estudio 37
3.3.2.2. Formulación de tratamientos 37
3.3.3. Variables de respuesta 38

3.3.3.1. Tinción de las estructuras esenciales del embrión 38
3.3.3.2. Tejido vivo del eje embrionario 38
3.3.3.3. Tonalidades y patrones de tinción 39
3.3.3.4. Porcentaje de viabilidad 39
3.3.3.5. Categoría 39
3.3.4. Evaluación para la viabilidad 40
3.3.5. Evaluación para germinación 40
3.3.6. Análisis estadístico 40
3.3.6.1. Análisis de varianza y pruebas de medias 40
3.3.6.2. Distribución de frecuencias 41
3.3.6.3. Análisis para la pérdida de viabilidad 41
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 42
4.1. Estructura del fruto, semilla y embrión del copoazú (*Theobroma grandiflorum*) 42
4.2. Tinción de las estructuras esenciales del embrión 44
4.3. Tejido vivo del eje embrionario (TVEE) 46
4.4. Viabilidad 53
4.5. Tonalidades de patrones de tinción 54
4.6. Categoría 55
4.7. Método de preparación de las semillas 56
4.7.1. Porcentaje de humedad 56
4.7.2. Preparación de las semillas 57
4.8. Porcentaje de germinación 59
4.9. Comparación viabilidad / germinación 61
4.9.1. Comparación porcentaje de viabilidad y porcentaje de germinación 62
4.10. Pérdida de viabilidad de semillas 63
4.11. Mapa topográfico de viabilidad de la semilla 64

4.12. Protocolo de viabilidad mediante el ensayo topográfico al tetrazolio 68

5. CONCLUSIONES 70

6. RECOMENDACIONES 71

7. BIBLIOGRAFÍA 73

8. ANEXOS 78

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del Copoazú. 5

Cuadro 2. Composición porcentual del fruto según diferentes autores (manual técnico sobre el cultivo y utilización (Bedoya y Mejia, 2003). 13

Cuadro 3. Composición química de la semilla de Copoazú deshidratadas 14

Cuadro 4. Cantidad de sal de TZ a utilizarse por cada 100 ml de solución 27

Cuadro 5. Número de semillas por tratamiento 28

Cuadro 6. Distribución de prueba de germinación 35

Cuadro 7. Combinación de los factores de estudio para los tratamientos. 38

Cuadro 8. Porcentajes de tinción en radícula, hipocótilo, epicótilo y plúmula 44

Cuadro 9. Análisis de varianza para la variable tejido vivo del eje embrionario (TVEE) 46

Cuadro 10. Prueba de rango múltiple Duncan para testigos vs factorial 47

Cuadro 11. Prueba de rango múltiple Duncan para temperaturas 48

Cuadro 12. Prueba de rango múltiple Duncan para concentraciones 49

Cuadro 13. Prueba de rango múltiple Duncan para la interacción temperatura por concentración 50

Cuadro 14. Prueba de rango múltiple Duncan para el factor tiempo y testigos 51

Cuadro 15. Distribución de frecuencias para la variable categoría 55

Cuadro 16. Porcentaje de humedad en semillas de *Theobroma grandiflorum* 56

Cuadro 17. Comparación de viabilidad y germinación de semillas de copoazú 62

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Esquema del desarrollo de Copoazú desde la etapa de germinación hasta 7

Figura 2. Variedades comerciales del género *Theobroma* (Muller *et al.*, 2000). 8

Figura 3. Porcentaje de germinación de copoazú en vivero para tres procedencias en.... 12

Figura 4. Copoazú (*Theobroma grandiflorum*) a) Fruto b) Pulpa 13

Figura 5. Esquema del proceso de oxidación del tetrazolio (ISTA, 2003) 17

Figura 6. Ubicación del laboratorio INIAF (Google maps) 21

Figura 7. Pesaje del fruto, pulpa y semillas de copoazú. 24

Figura 8. Proceso de germinación de semillas de copoazú 24

Figura 9. Observación detallada de la anatomía del embrión A) Semilla de copoazú con radícula elongada. B) Corte del endospermo para una mejor visibilidad del embrión. C) Extracción del embrión con la radícula elongada. D) Vista en estereoscopio de la plúmula 25

Figura 10. Distribución de las cámaras de germinación conforme 26

Figura 11. Preparación de la solución de tetrazolio. A) 2-3-5 trifenil cloruro de tetrazolio. B) Pesaje del tetrazolio. C) Dilución de la sal de tetrazolio en agua destilada. D) Solución de tetrazolio preparada y diluida. 27

Figura 12. Árbol de copoazú del cual se obtuvo la semilla. 29

Figura 13. Proceso de despulpado del fruto de copoazú para la obtención de la semilla A) Pesaje del fruto de copoazú. B) Separación de epicarpio de la pulpa. C) Extracción de la pulpa y semilla. D) Separación de la semilla y la pulpa con ayuda de tijeras. 30

Figura 14. Pesaje inicial y final de cinco semillas para el cálculo de humedad. 30

Figura 15. Remoción de la cubierta seminal A) semilla con pulpa o mucílago removido, B) Remoción manual de la cubierta seminal, C) Semilla con el tegumento semi extraido, D) Semilla con el tegumento totalmente extraido 31

Figura 16.Preparación de las semillas A) Semilla sin corte B) Semilla con un corte longitudinal C) Semilla con doble corte 32

Figura 17. Proceso de despulpado del copoazú para la siembra A) Despulpado de la semilla. B) Enjuague de las semillas con dióxido de cloro y agua destilada. C) Secado de las semillas previo a la siembra. 34

Figura 18. Esterilización del sustrato y siembra de las semillas de copoazú. A) Autoclave vertical automatizado. B) Sustrato esterilizado (tierra negra y turba). C) Sustrato humedecido a Capacidad de campo. D) Siembra de las semillas (20 semillas por bandeja). E) Semillas sembradas sometidas a temperatura controlada 34

Figura 19. Semilla fresca y semilla sometida a bajas 35

Figura 20. Evaluación visual del embrión a través del estereoscopio. 40

Figura 21. Estructura del fruto de copoazú (*Theobroma grandiflorum*) 42

Figura 22. Estructura de la semilla de copoazú (*Theobroma grandiflorum*) 43

Figura 23. Estructura del embrión de la semilla de copoazú (*Theobroma grandiflorum)* ... 43

Figura 24. Coloración de partes esenciales del eje embrionario 45

Figura 25. Prueba de rango múltiple Duncan para testigos vs factorial de la variable 47

Figura 26. Prueba de rango múltiple Duncan para el factor temperatura de la variable 48

Figura 27. Prueba de rango múltiple Duncan para el factor concentración de la 49

Figura 28. Prueba de rango múltiple Duncan para la interacción temperatura 51

Figura 29. Prueba de rango múltiple Duncan para el factor tiempo y testigos 52

Figura 30. Distribución de frecuencias para la variable viabilidad 53

Figura 31. Distribución de frecuencias para la variable tonalidad de patrones de tinción . 54

Figura 32. Representación en gráfico de la distribución de frecuencia pertenecientes a las diferentes categorías 56

Figura 33. Tejido con coloración (vivo) del eje embrionario 57

Figura 34. Semilla de copoazú con y sin tinción con tegumento removido e integumento visible 58

Figura 35. Reacción del tejido del embrión al tetrazolio 59

Figura 36. Porcentajes de germinación bajo diferentes temperaturas 60

Figura 40. Proceso de germinación de la semilla de copoazú 61

Figura 38. Comparación del % de viabilidad y % de germinación..... 62

Figura 39. Pérdida de viabilidad de la semilla de copoazú 63

Figura 40. Comparación de una semilla totalmente muerta con 64

Figura 41. Mapa topográfico de semillas de copoazú mediante los patrones 65

Figura 42. Protocolo de viabilidad mediante la prueba topográfica al tetrazolio, en laboratorio del departamento de La Paz 68

Figura 43. Protocolo de viabilidad mediante la prueba topográfica al tetrazolio en lugar de cosecha (producción)..... 69

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Mapa topográfico de viabilidad en semillas de copoazú 78

Anexo 2. Croquis experimental..... 79

Anexo 3. Prueba de tetrazolio en cacao (*Theobroma cacao*) 80

ABREVIATURAS

TZ	Tetrazolio
cm	Centímetro
INIAF	Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal
ISTA	International Seed Testing Association
mm	Milímetro
m	Metro
h	Hora u horas
T.ª	Temperatura
ml	Mililitros
L	Litro
Kg	Kilógramo
g	Gramo

RESUMEN

Dentro de nuestra Amazonía contamos con una gran riqueza en diversidad de especies, el copoazú, en los últimos años este cultivo comienza a tomar importancia dentro del mercado debido a sus propiedades. Sin embargo, existe poca información sobre su comportamiento empezando por la semilla. El siguiente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar la viabilidad de semillas de Copoazú (*Theobroma grandiflorum*) mediante la prueba bioquímica del tetrazolio, en condiciones de laboratorio. Se empleó un diseño completamente al azar con arreglo trifactorial y tratamientos extra (testigos), los factores fueron temperatura (25, 35 y 30°C), concentración de tetrazolio (0.15, 0.30 y 0.50%) y tiempo de tinción (24, 48 y 72 horas), en los tratamientos extra (testigos) se realizó disección simple y doble. Se evaluó pérdida de viabilidad analizando semillas frescas, semillas con tres y cuatro días almacenadas, se germinó semillas bajo las mismas temperaturas para comparación. Los mejores resultados se presentaron en los tratamientos extra (30°C, 0.50% tetrazolio y 24 horas), seguida de los tratamientos bajo 25°C con ambas concentraciones de 0.15 y 0.30% tetrazolio, sin embargo, con 0.15% requieren mayor tiempo presentando viabilidades inferiores al 50%, tratamientos bajo 35°C no reflejaron buenos resultados, no obstante, la germinación fue mejor que en 25°C. En base a los resultados se establecieron 25 y 30°C como óptimas, 0.30 y 0.50% de tetrazolio, finalmente 24 y 48 horas dependiendo la concentración y preparación de la semilla. El método de preparación de la semilla se resume en; remoción de pulpa y tegumento, corte longitudinal y doble enjuague en agua destilada. La pérdida de viabilidad se debió a la baja temperatura por su comportamiento recalcitrante, el mapa topográfico se reflejó en 12 categorías, 4 viables y el resto no viables, se generó dos protocolos de evaluación de la viabilidad de semillas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*) mediante la prueba topográfica al tetrazolio para laboratorio y campo.

ABSTRACT

Within our Amazon we have a great wealth of species diversity, the copoazú is one of them that had been little studied, in recent years it is beginning to gain importance in the market and its properties are being used. However, little is known about the behavior of the crop starting from the seed. The following work was carried out with the objective of evaluating the viability of Copoazú (*Theobroma grandiflorum*) seeds through the biochemical tetrazolium test, under laboratory conditions. A completely randomized design with a three-factor arrangement and extra treatments was used, the factors were 25, 35 and 30°C; 0.15, 0.30 and 0.50% TZ; 24, 48 and 72 h and in the extra treatments, simple and double dissection was performed, loss of viability was evaluated by analyzing fresh seeds, seeds with three and four days stored, seeds were germinated under the same temperatures to compare them with viability. The best results were presented in the extra treatments (30°C, 0.50% TZ and 24 h), followed by the treatments under 25°C with both concentrations of 0.15 and 0.30% TZ, however, those with 0.15% require more time. staining presenting viability percentages lower than 50%, treatments under 35°C did not reflect good results, however, germination was better than at 25°C. Based on the results, 25 and 30°C were established as optimal, 0.30 and 0.50% TZ finally 24 and 48 hours depending on the concentration and preparation of the seed. The seed preparation method is summarized as; removal of pulp and integument, longitudinal cutting and double rinsing in distilled water. The loss of viability was due to the low temperature due to its recalcitrant behavior, the topographic map was reflected in 12 categories, 4 viable and the rest non-viable, two protocols for evaluating the viability of copoazú seeds (*Theobroma grandiflorum*) were generated using the tetrazolium topographic test.

1. INTRODUCCIÓN

La Amazonía boliviana es hábitat de una innumerable diversidad de especies, con una gran riqueza en recursos silvestres como la Castaña, Asaí, Copoazú y Majo. Asociaciones como AAGROPAMA (Asociación Agropecuaria de Productores Amazónicos de Majo y Asaí), ISOAGRI, ASINE FARM, entre otros, compuestos por un grupo de productores se dedican al procesado y venta de la pulpa. En los últimos años, especies nativas de la Amazonia, tales como el asaí (*Euterpe oleracea*), el camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) Mc Vaugh), la castaña (*Bertholletia excelsa*), el arazá (*Eugenia stipitata*), la cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal) y, principalmente, el copoasú (*Theobroma grandiflorum*), vienen despertando gran interés por parte de los agricultores y grupos empresariales (Pro Tempore y FAO, 1999).

El aprovechamiento del cultivo de copoazú se realiza de especies silvestres necesitando ser domesticadas, de esta manera estar disponible, al encontrarse en lugares alejados el precio es elevado tomando en cuenta el transporte. En la actualidad, a pesar de su gran potencial económico, se conoce poco sobre los mecanismos que permitan un adecuado aprovechamiento y manejo de este recurso a mayor escala, principalmente enfocados al comportamiento de las semillas. La ISTA (International Seed Testing Association) es la institución que normaliza los métodos y técnicas para evaluar semillas designadas para el desarrollo de los cultivos o la producción de plantas, su misión es desarrollar, adaptar y publicar los procedimientos estándar para el muestreo y análisis de las semillas objeto de comercio internacional, (ISTA, 2007).

El Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal (INIAF), a través del control de calidad de semillas dispone de ciertas metodologías de laboratorio en base a las reglas ISTA, permiten alcanzar un importante grado de confiabilidad en la toma de decisiones comerciales, en el momento de la siembra o del almacenamiento. Según INIAF (2020), el proceso de fiscalización se aplica a semilla: importada, certificada en gestiones pasadas, semillas para lo cual no se cuenta con normas específicas de Certificación, semillas que cuentan con normas establecidas y semillas de uso propio.

1.1. Antecedentes

Sanchez *et al.* (2003), propuso en su trabajo de investigación, evaluar las características morfo-anatómicas de las semillas entre ellas el Copoazú (*Theobroma grandiflorum*) siguiendo las normas internacionales ISTA, para evaluar la viabilidad de las semillas utilizó

una solución acuosa 2-3-5 trifenil cloruro tetrazolio (método bioquímico) al 1%, sin embargo, no menciona el tiempo ni la temperatura a la cual fueron sometidas. Por otro lado Amaya y Motta (2008), determinaron la viabilidad, germinación, emergencia y clasificación de la semilla de Copoazú (*Theobroma grandiflorum),* utilizaron una concentración de tetrazolio al 0,5% por 24 horas a 30ºC, obteniendo un resultado del 95%±5% de viabilidad en semillas recién cosechadas, concluyendo que la semilla de Copoazú es Recalcitrante Tropical.

Pérez (2008) por su lado, indica que el tiempo de evaluación de la prueba de tetrazolio para estimar la viabilidad en semillas de *Gossipium lobatum*, se puede reducir significativamente utilizando concentraciones de 0,75 a 1.0 % durante 14 horas de exposición, en contraste al recomendado por el ISTA. Al contrario de Pérez y López (2017) realizaron la utilización de la solución de tetrazolio al 0,1%, en semillas de cacao (*Theobroma cacao*), sin embargo, los resultados no se muestran claros ya que el tiempo de inmersión solo fue de 30 minutos.

1.2. Planteamiento del problema

El cultivo de copoazú al ser bien recibida en sus diferentes sub productos, los productores requieren producir en sus parcelas, para ello se debe contar con buena semilla. El éxito de la producción de plantines mucho depende de la calidad de la semilla, en este sentido el productor deberá proveerse con semilla de calidad. En Bolivia, el INIAF es la única entidad competente de expedir certificación de semillas y, a través de la dirección de semillas verifica la calidad fisiológica (germinación, viabilidad), física (libre de piedras, malezas, semillas partidas, resto de cosecha), sanitaria (evaluación de plagas y enfermedades) y genética (característica fenotípicas y genotípicas de la variedad) siguiendo las reglas de la ISTA.

Como ya se mencionó de manera introductoria la ISTA es la institución que normaliza los métodos y técnicas para evaluar semillas en laboratorio, pero aún no cuenta con normas reglamentadas para el análisis de semillas de Copoazú (*Theobroma grandiflorum),* no se cuenta con parámetros de evaluación de las semillas para estimar su comportamiento una vez sembrado en campo, debido a que en un ambiente real de germinación no se puede controlar con precisión ciertos factores como: temperatura, luz, humedad, sales, nitratos, exudados de otras plantas, residuos de herbicidas que afectan la emergencia y el establecimiento inicial de las plántulas.

1.3. Justificación

A falta de una norma específica para la certificación y fiscalización en semillas de Copoazú, como INIAF nos enfocamos en la calidad fisiológica de la semilla (viabilidad y germinación) para iniciar con la generación de una norma. Existen varios métodos para determinar la viabilidad de las semillas entre ellos métodos colorimétricos como el test de tetrazolio (2-3-5 Trifenil Cloruro Tetrazolio) que se implementa en una gran variedad de especies (Salazar y Manrique, 2015), ésta prueba bioquímica de viabilidad del test topográfico al tetrazolio, es más rápida, ocupa menos espacio y tiempo respecto a la prueba convencional, sin embargo, en términos de costo es mayor, por lo que se pretende encontrar la concentración adecuada del producto para optimizar su uso.

Con los resultados del trabajo de investigación, se determinará un protocolo adecuado para la prueba de viabilidad con tetrazolio en semillas de Copoazú, que contempla cantidades de tetrazolio, temperaturas y tiempos de tinción, optimizando tiempo, espacio y en lo posible efectivizando el producto, implementando una mejor alternativa para verificar la viabilidad y germinación de las semillas. Aportando dicha metodología a la generación de una normativa técnica para certificación y fiscalización del cultivo de Copoazú (*Theobroma grandiflorum*). A la vez se contará con un mapa topográfico de viabilidad de la semilla de Copoazú mediante el test al tetrazolio que permita una mejor identificación al momento de realizar esta prueba.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

- Evaluar la viabilidad de semillas de Copoazú (*Theobroma grandiflorum*) mediante la prueba bioquímica del tetrazolio, en condiciones de laboratorio.

1.4.2. Objetivos específicos

- Establecer diferentes concentraciones de tetrazolio, temperaturas y tiempos de tinción que permitan una óptima condición para la evaluación de las semillas de Copoazú, en sus diferentes tratamientos.

- Determinar un método de preparación de la semilla que faciliten su interpretación mediante la tinción.

- Diagnosticar las causas de deterioro y pérdida de viabilidad de las semillas en base al análisis de los resultados, bajo el efecto de los diferentes tratamientos.

- Elaborar un mapa topográfico de viabilidad de la semilla de Copoazú (*Theobroma grandiflorum*) mediante el test al tetrazolio.

- Elaborar un protocolo de viabilidad por el método bioquímico al tetrazolio, a fin de aportar en la generación de una normativa técnica de certificación y fiscalización de semillas de Copoazú (*Theobroma grandiflorum*).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cultivo de Copoazú

La producción del cultivo de Copoazú (*Theobroma grandiflorum*) se viene desarrollando en gran escala en la región de Madre de Dios, sin embargo presenta elevadas pérdidas en su cosecha y aprovechamiento de la semilla, debido al poco o ningún estudio realizado en el beneficio de la semilla, el copoazú es un producto de gran potencialidad en la agroindustria chocolatera, (Villagra *et al.*, s.f.).

2.1.1. Taxonomía

La taxonomía del cultivo de copoazú se refleja en el cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del Copoazú.

Reino	*Plantae*
Subreino	*Tracheobionta*
División	*Magnoliophyta*
Clase	*Magnoliopsida*
Subclase	*Malvales*
Familia	*Malvaceae*
Subfamilia	*Byttnerioideae*
Tribu	*Theobromeae*
Género	*Theobroma*
Especie	*Grandiflorum*

Fuente: Angiosperm Philogenetic Group (2010).

2.1.2. Descripción botánica del Copoazú

El árbol puede alcanzar alturas hasta 18 m en estado silvestre, cultivado alcanza una altura entre 5 m a 8 m, presenta ramificación tricotómica a partir de los 14 meses en promedio, crece en etapas cada metro o metro y medio. Las ramas son plagiotrópicas. La formación o estructura de las mesas o ramificaciones es importante para una producción balanceada de frutos. Las hojas son simples subcoriáceas, lámina foliar oblonga u oblonga-ovalada, glabra de color verde en el haz y verde claro o rosado en el envés. Las inflorescencias están ubicadas en la parte apical de las ramas plagiotrópicas en número de 3 a 5. Flor pentámera, 5 sépalos y 5 pétalos. Ovario súpero pentagonal con 5 lóculos multiovalados. Frutos en baya drupácea de forma elipsoide u oblonga, con exocarpio rígido, leñoso y verde

recubierta por una coloración ferruginosa y polvosa que se desprende al manipular. Por otro lado, Velez (1991) menciona que el fruto es una baya anfisarca, posee diferentes formas: ovada, elíptica y oblonga, generalmente tiene ápice y base terminados en punta. La cáscara es de 1cm de grosor, dura, recubierta por pilosidades de color café rojizo, la pulpa que rodea las semillas es blanca, crema o amarillo cremoso. El mesocarpio es blanco de 7 mm de espesor. El fruto puede contener de 20 a 50 semillas, pero existen plantas que producen frutos sin semillas, (Vargas y Bolaños, 1997). Aunque Sterling *et al.* (2015), menciona que el fruto puede contener de 20 a 50 semillas pero existen plantas que producen frutos sin semillas.

2.1.3. Requerimientos edafoclimáticos

El copoazú tiene como habitad natural el bosque tropical húmedo de las tierras altas no inundables sombreado parcialmente por los árboles de mayor tamaño. Las condiciones climáticas favorables para su desarrollo son bastante variables. En las zonas de ocurrencia natural, la temperatura varía entre 21,6 a 27, 5º C, la humedad relativa del aire entre 64 y 93 % y las precipitaciones anuales pueden estar entre 1900 y 3100 mm. Se ha observado buen desempeño de la especie en regiones con clima sub húmedo, con lluvias anual superior a 22ºC. (Villachica, 1996 citado por Lucias, 2017).

2.1.4. Fenología

La principal forma de obtención de plantas es aún por semillas lo que desalienta su cultivo, visto que la planta demora de 3,5 a 5 años para entrar a producir, (Rodriguez *et al.*, 2008).

No obstante, Aleman y Laime (2013), mediante la figura 1 señala en días el desarrollo de la plántula de copoazú desde la germinación. Se completa la etapa de germinación y trasplante a las bolsas en un periodo de 68 días**,** la etapa de vivero y el trasplante al lugar definitivo en 180 días, la etapa de crecimiento hasta la primera floración ocurre entre los 450 días. Según el grafico la floración dura aproximadamente 140 días, entre los meses de agosto a diciembre, sin embargo, la fructificación comienza en el mes de noviembre a marzo, finalmente la cosecha ya se puede realizar entre los meses de febrero a junio.

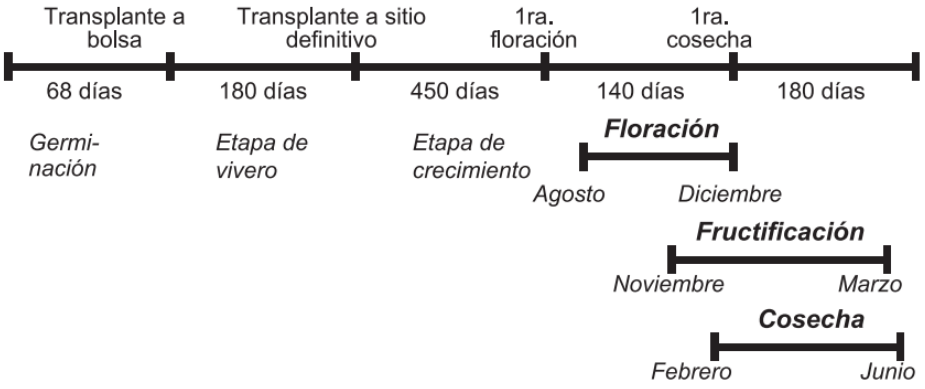


Figura 1. Esquema del desarrollo de Copoazú desde la etapa de germinación hasta la etapa de fructificación (Aleman y Laime, 2013)

2.1.5. Importancia del Copoazú en Bolivia

El principal producto obtenido del fruto del copoazú es la pulpa congelada del fruto al natural. Para tal efecto la pulpa es extraída cumpliendo normas de calidad que permiten conservar su exquisito sabor y agradable aroma. La pulpa es utilizada para preparar refrescos, helados, néctares, mermeladas, vino, licores y otros productos frescos. De la semilla del fruto se obtiene manteca de copoazú, muy utilizada en la formulación de cosméticos hidratantes y en la industria alimenticia. De las semillas molidas se obtienen una pasta similar al chocolate de cacao, denominada “copulate”. Finalmente, la cascara es utilizada como abono orgánico en los sistemas agroforestales y debidamente procesada constituye un componente en el alimento para animales de cría (IBCE, 2010).

2.1.6. Variedades

El taxonoma genérico *Theobroma* engloba además del cacao (*Theobroma cacao*) y el copoazú (*Theobroma grandiflorum*), más de 20 especies todas originarias de América tropical y está dividido en seis secciones: *Rhytidocarpus, Oreanthes, Theobroma, Telmatocarpus, Glossopetalum y Andropetalum*. El copoazú está clasificado en la sección *Glossopetalum*, que es la mayor, englobando 12 de las 22 especies del género (Cuatrecasas, 1964) citado por (Pro Tempore and FAO, 1999).

En la Amazonia brasileña, el género está representado por las especies *T. bicolor* Humb & Bonpl., *T. cacao* L., *T. canumanense* Pires et Fróes, *T. grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum, *T. microcarpum* Mart., *T. obovatum* Klotsch ex Bernoulli, *T. speciosum* Willd., *T. subincanum* Mart., y *T. sylvestre* Mart., conocidas en la región, dentro de otras

denominaciones comunes, como: cacao del Perú, cacao, copuaçu do mato, copuaçu, cacao, jacaré, careça de urubú, cacauí, cupuí e cacao azul respectivamente (Cuatrecasas, 1964) citado por (Pro Tempore y FAO, 1999).

2.1.7. Variedades comerciales

Aunque existe más de 20 especies del género *Theobroma*, dentro de ellas existen tres variedades comerciales que Muller *et al.* (2000) lo reflejó en la figura 2, de la cual el cacao es el más comercial, sin embargo, el copoazú comienza a tomar importancia dentro de estas especies seguida del malambo o *Theobroma bicolor*.

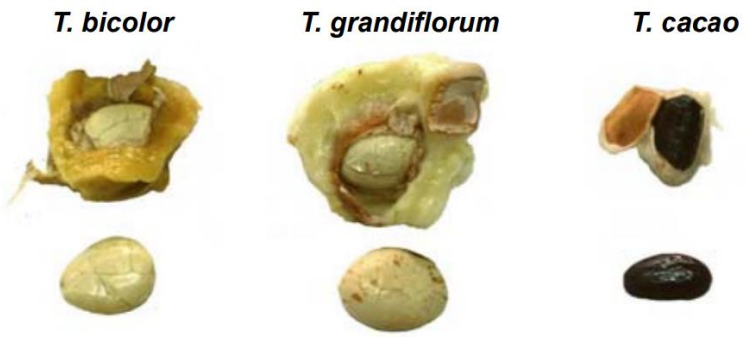


Figura 2. Variedades comerciales del género *Theobroma* (Muller *et al.*, 2000).

2.2. La semilla

La semilla se forma a partir del rudimento seminal, localizado en el ovario de las flores, tras producirse la fecundación por los granos de polen. Comprende estructuras reproductoras diversas quienes en conjunto cumplen la función principal de perpetuar la especie, dando vida a una nueva planta idéntica a la anterior (Megías *et al.*, 2018) y (GRLL, s. f.).

Las semillas están compuestas de diversos órganos. Estas se pueden agrupar, arbitrariamente en las siguientes categorías:

a) **Cubierta seminal** (testa, pericarpio, etc.). La cubierta seminal funciona como órgano de transporte de agua, con su curva característica de absorción.
b) **Tejidos nutritivos de reserva** (cotiledones, endosperma, perisperma, etc.). El endosperma y los cotiledones absorben agua lentamente; actúan como reservorios de agua y no como estructuras activas de absorción.

c) **Eje embrionario** (compuesto de radícula, plúmula y estructuras asociadas). El eje embrionario absorbe agua rápida y continuamente (Courtis, 2013). Estos componentes absorben agua a diferentes velocidades y magnitudes.

Para Chuncho *et al.* (2019), la estructura de la semilla consta de las siguientes partes

a) **Tegumento o epispermo**. Es la envoltura externa que protege a la semilla de factores como: la desecación excesiva, lesiones mecánicas, jugos digestivos de animales y gérmenes patógenos. Esta estructura presenta dos capas.

- **Testa**. Es la capa más externa, formada por tejidos esclerenquimático, es dura brillante y presenta una variedad de colores.
- **Tegmen**. Es una capa membranosa que tapiza internamente la testa.

b) **Hilo u ombligo**. Se llama así a la cicatriz que deja el fonículo al separarse de la semilla.

c) **Micrópilo.** Se observa en la testa cerca al hilo. Al comienzo de la germinación el agua entra por el micrópilo.

d) **Embrión**. Es la parte viva de la semilla. A partir del embrión se forma la nueva planta. Consta de las siguientes partes:

- **Cotiledones**. Son hojas modificadas, que almacenan alimentos para nutrir a la plántula al iniciarse la germinación.
- **Epicótilo**. Se llama así a la parte del embrión que se encuentra por encima de la inserción de los cotiledones. En el extremo superior del epicótilo se encuentra la plúmula o gémula, constituida por tejido meristemático, que dará origen a los elementos del sistema caulinar.
- **Hipocótilo**. Es la parte del embrión que se encuentra por debajo de la inserción de los cotiledones. En el extremo inferior de esta estructura se encuentra la radícula, encargado de originar los tejidos de la raíz principal.

e) **Endospermo**. Tejido nutritivo constituido por células 3N que nutre al embrión en las primeras etapas de la germinación de la semilla. Inicialmente todas las semillas poseen endospermo, pero en algunas semillas como el frijol, a medida que la semilla madura el embrión lo va absorbiendo hasta llegar a tener poco o nada del mismo, cuando está completamente formada.

2.2.1. Almacenamiento de las semillas

2.2.1.1. Conducta de almacenamiento de semillas ortodoxas

Las semillas ortodoxas poseen una gran tolerancia a la deshidratación. Su fase final de maduración está acompañada por deshidratación celular, la cual inicia con la pérdida de agua del suministro vascular de la planta madre a la semilla. En este período las semillas adquieren la tolerancia para ceder a la deshidratación, característica que mejora su viabilidad y el potencial de almacenamiento (Bewley y Black, 1994; Nkang, 20002 y Hoekstra *et al.*, 1994).

2.2.1.2. Conducta de almacenamiento de semillas recalcitrantes

Por el contrario, las semillas recalcitrantes no experimentan perdida de agua en la planta madre, ni detienen su desarrollo de manera que pasan directo a la germinación con las condiciones óptimas. Ante condiciones de baja humedad tienden a perder la capacidad de germinación y, en el caso de semillas recalcitrantes tropicales son sensibles a bajas temperaturas (menores a 15º C). Estas características dificultan en gran escala la capacidad de almacenamiento a largo plazo (Magnitskiy y Plaza, 2007).

Se conoce que, en semillas recalcitrantes, posterior a su diseminación, la producción de radicales libres de oxígeno (RLO) es controlada por el metabolismo de la semilla, la deshidratación provoca la baja eficiencia de los sistemas antioxidantes, esta actividad está asociada con la perdida de viabilidad en semillas de carvallo y otros árboles en el cual el ácido ascórbico por sí solo es incapaz de evitar el daño oxidativo provocado por la deshidratación. Como resultado viene la peroxidación de la membrana, seguido por la desintegración y muerte celular (Berjak y Pammenter, 2004; Chaitanya *et al*., 2000; Hendry *et al*., 1992 y Leprince *et al*., 1999 citado por Magnitskiy y Plaza, 2007).

Otro factor involucrado en la recalcitrancia de las semillas es el contenido de ácido abcsícico (ABA), quien influye en la síntesis de proteínas implicadas en la adquisición del estado de latencia y tolerancia a la deshidratación, por lo que, las semillas con bajo contenido de ABA desarrollaran una delgada testa, lo que lo convierte en susceptible a la pérdida de agua (Magnitskiy y Plaza, 2007).

2.2.1.3. Conducta de almacenamiento de semillas intermedias

Este grupo de semillas presenta un comportamiento entre semillas ortodoxas y recalcitrantes, es decir; si bien una semilla tiene cierto grado de tolerancia a la deshidratación sin alterar la viabilidad, posee una pérdida de viabilidad en temperaturas bajas, tal es el caso de café (*Coffea arabica*), por otro lado al no existir perdida de viabilidad ante temperaturas bajas, son sensibles a la perdida de agua por parte de la semilla como la *Phoenix reclinata* (Palma datilera silvestre), sin embargo, este tipo de semillas tienden a almacenarse por un tiempo más prologado en relación a las recalcitrantes (Magnitskiy y Plaza, 2007).

2.2.2. Características y partes de las semillas tropicales

Pennington y Sarukhan (1968) citado por Mamani (2006), mencionan que, las semillas tropicales, empezando por el exterior, la cubierta de la semilla (testa) rodea a ésta completamente. La testa varía desde membranosa a muy leñosa. La semilla está unida a la pared del ovario por medio de un funículo filiforme. El punto de unión del funículo a la semilla se conoce como hilio y en este punto puede originarse una excrecencia carnosa llamada arilo. Dentro de la semilla, e incluyendo el embrión puede encontrarse cierta cantidad de material de reserva alimenticia conocida como endospermo.

2.2.3. Semilla de Copoazú

El fruto es una baya, cuenta con diferentes formas como la oblonga, ovalada, elipsoide, oval, elíptica o redonda, se compone de un pericarpio, cáscara dura recubierta por unas pilosidades de coloración café rojizo (Souza, 2007)y (Rondón and Cumana, 2005). Contiene entre 20 y 50 semillas, promedio 32, superpuestas en hileras verticales en torno a la placenta, envuelta por abundante pulpa blanco amarillenta, acidulada y con aroma característico (Villachica, 1996) citado por (Lucias, 2017). Para Urano *et al.* (2009), el promedio de semillas también es alrededor de 32,sin embargo, dependiendo del tamaño de este, puede variar de 9 a 62, siendo con mayor frecuencia de 36 a 44 semillas por fruto.

Mediante la aplicación del método de clasificación de semillas de Hong *et al*., (1996) citado por Amaya y Motta (2008), determinó que las semillas de Copoazú *Theobroma grandiflorum* es de tipo recalcitrante tropical.

La figura 3 refleja los porcentajes de germinación en semillas de copoazú procedentes de Valle Sacta, Puerto Aurora y Paractito bajo tres niveles de sombra (Sombra natural, 50% de sombra y 80% de sombra). En los resultados del grafico de barras se puede apreciar menor porcentaje de germinación bajo sombra natural, y mayor porcentaje en semillas sometidas a 80% de sombra (Aleman y Layme,2013).

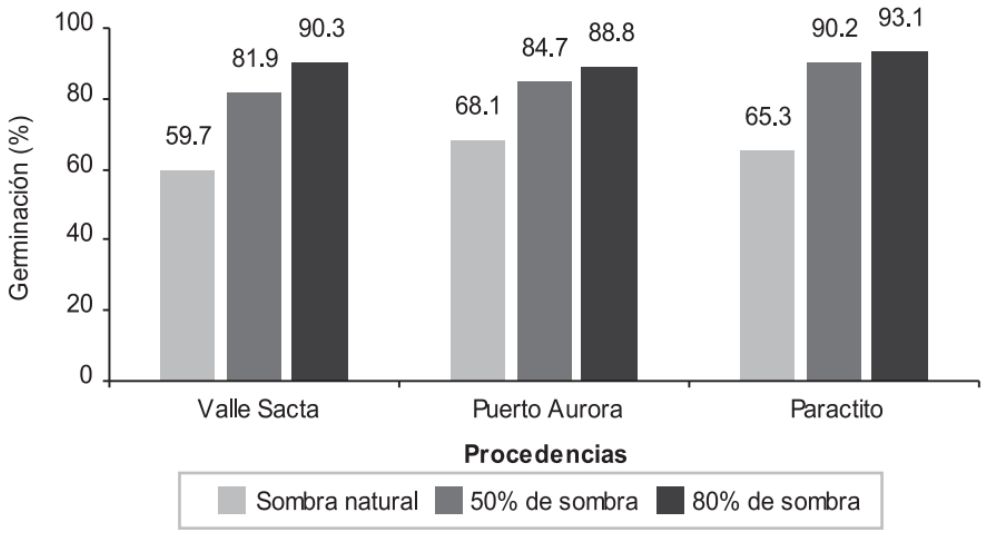


Figura 3. Porcentaje de germinación de copoazú en vivero para tres procedencias en tres niveles de sombra (Aleman and Laime, 2013).

2.2.3.1. Morfología de la semilla de Copoazú

Inicialmente la semilla de Copoazú está constituida por la testa de color marrón, el eje embrional, el cual está formado por la plúmula, el hipocótilo, dos cotiledones y la radícula. La semilla posee endospermo; el complejo plúmula radícula está situada entre los cotiledones a un lado del grano contra la testa, de tal manera que la radícula este en contacto con el micrópilo y la plúmula está encerrada hacia el interior del grano. El complejo plúmula radícula, ocupa solo una parte muy reducida del espacio libre entre los cotiledones (Bedoya y Mejia, 2003).

Entre sus estructuras se encuentra la radícula, de color blanco, es la primera parte del embrión que emerge con el paso de los días su coloración cambia de blanco a café, produciendo raíces secundarias y pelos absorbentes. La plúmula, es una yema de color blanco se encuentra a lado opuesto de la radícula. El hipocótilo, es el espacio entre la radícula y la plúmula. El hipocótilo, está situado a continuación de la radícula dando origen

al tallo. Finalmente los cotiledones, adquieren la función de primeras hojas o de reserva alimenticia, a veces ambas cosas a la vez (Bedoya y Mejia, 2003).

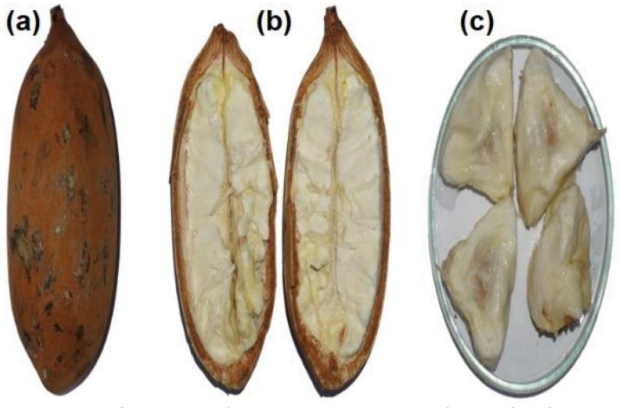


Figura 4. Copoazú (*Theobroma grandiflorum*) a) Fruto b) Pulpa c) Semillas (Bedoya and Mejia, 2003).

La figura 4 refleja el fruto, pulpa y semillas de copoazú de manera representativa y en términos de promedio, la corteza corresponde al 44.6%, la pulpa del 37.7% y finalmente las semillas un 17.7% del peso total respectivamente como se muestra en el cuadro 2**.**

Cuadro 2. Composición porcentual del fruto según diferentes autores (manual técnico sobre el cultivo y utilización (Bedoya y Mejia, 2003).

Parte del fruto	Santos & Condurú (1972)	Barbosa et al. (1979)	Calzavara et al. (1984)	Media
Corteza (%)	46,0	42,0	46,0	44,6
Pulpa (%)	37,0	40,0	36,0	37,7
Semilla (%)	17,0	18,0	18,0	17,7

2.2.4. Composición de la semilla de copoazú

Las semillas son esencialmente oleaginosas, con un contenido de lípidos superior al 50%, presentando cantidades considerables de proteínas y carbohidratos (cuadro 3). Los principales ácidos grasos presentes en el aceite son los ácidos oleico y esteárico. En proporciones menores se encuentran también los ácidos araquídico, palmítico, linoleico, bénico, galadoléico, heptadecanoico y palmitoléico (Chaar, 1980; Silva 1988) citado por (Pro Tempore and FAO, 1999).

Cuadro 3. Composición química de la semilla de Copoazú deshidratadas

Componente	Contenido (%)[1]	Contenido (%)[2]
Proteína	11,9	20,0
Lípido	57,32	50,8
Carbohidrato	24,25	15,9
Ceniza	4,07	3,7
Fibra	1,94	9,6

2.2.5. Propagación del copoazú

El copoasú puede ser propagado tanto por vía sexuada como por procesos asexuados, particularmente por injerto, aunque este último es de uso limitado debido a problemas de auto-incompatibilidad genética (Pro Tempore and FAO, 1999).

La reproducción asexual de copoazú mediante estacas para Bedoya and Mejia (2003), no mostraron resultados promisorios, debido a que no son capaces de formar raíces y se mueren, a pesar de formar brotes con el pasar de los días llega a un punto de mortalidad total. Al igual que Pro Tempore y FAO (1999), demostró que la propagación mediante estacas no son promisorias, ya que es difícil que las estacas originen raíz y mueren, a las cuatro semanas después de ser colocadas en el sustrato.

2.3. Normas de calidad en semillas

El estado plurinacional de Bolivia a través del INIAF se encarga de establecer normas y reglas para la certificación de semillas. Estas reglas representan el resultado de experiencias de investigadores y analistas de todo el mundo. El INIAF, mediante la Dirección Nacional de Semillas tiene el compromiso de garantizar la disposición de semillas, propagación, calidad genética, fisiológica, física y fitosanitaria (INIAF, 2014), para lo cual la semilla certificada debe tener los siguientes atributos:

- Pureza física: libre de semillas de otros cultivos y malezas, limpia sin basura, rastrojos ni piedrecitas.
- Pureza varietal: que no presente mezcla de otras variedades genéticamente.}
- Respuesta fisiológica: buena germinación, viabilidad y vigor.
- Sanidad: libre de insectos y enfermedades, no debe tener manchas ni perforaciones.

El NEWS (2015), indica que, la tecnología de producción de semillas de alta calidad contempla lo genético, fisiológico, físico o sanitario además de los principales desafíos para

las empresas productoras de semillas de diferentes especies para condiciones de diferentes agroecosistemas y disponibles principalmente por empresas públicas e instituciones de investigación y enseñanza.

2.3.1. Prueba de Germinación

La prueba de germinación determina en una muestra, una proporción de semillas vivas y capaces de producir plantas normales sobre condiciones favorables, (ISTA. 2007; MAPA, 2009).

2.3.2. Germinación

La germinación en laboratorio es la emergencia y desenvolvimiento de las estructuras esenciales del embrión, demostrando su aptitud para producir una planta normal sobre condiciones favorables de campo (ISTA, 2007).

En los ensayos realizados para comprobar el poder germinativo de las semillas se pretende, ante todo, conocer el valor potencial de éstas para la siembra. Así, la germinación queda definida como la capacidad de nacencia y desarrollo que presentan las semillas para transformarse en plántulas normales, con todas sus estructuras esenciales, cuando se las somete a determinadas condiciones favorables para su crecimiento, demostrando capacidad de producción (Lovato, 1981).

2.3.3. Porcentaje de germinación

El porcentaje de germinación de semillas en laboratorio, es la proporción del número de semillas que producen plántulas clasificadas como normales, en condiciones y periodos específicos, (ISTA, 2007).

2.3.4. Estructuras esenciales

Para que una plántula llegue a ser una planta normal debe presentar la siguieres estructuras esenciales: sistema radicular, parte aérea, yemas terminales y cotiledones; según los géneros serán necesarios otras partes, (MAPA, 2009).

2.3.5. Evaluación

Las semillas sometidas a un periodo de germinación según INIAF (2014), MAPA (2009) e ISTA (2007), son analizadas de tres formas:

a) Como semillas que desarrollaron en plántulas pueden ser:

- **Normales:** plántulas con todas sus estructuras esenciales bien desenvueltas, completas, proporcionales y sanas. Es decir, con desarrollo del tallo recto y la raíz presente, raíces secundarias desarrolladas con pelos absorbentes, cotiledones notorios y sanos.

b) Como semillas que no germinaron pueden ser:

- **Muertas:** semillas que por lo general han sido atacadas por hongos, y que no han presentado señal de inicio de germinación.
- **Duras:** semillas que no pudieron romper dormancia en la hidratación y mantuvieron su estructura endurecida.
- **Latentes:** semillas que siendo viables no germinaron con las características necesarias para ser consideradas normales.

c) Otra categoría de semillas que no germinaron, como:

- **Semillas vacías:** que apenas contienen un tejido residual.
- **Semillas sin embrión:** en las que no existe la cavidad embrionaria o no existe el embrión.
- **Semillas dañadas por insectos:** son semillas que contienen larvas o evidencia de ataque de insectos afectando su capacidad germinativa.

2.3.6. Prueba de viabilidad

La prueba de viabilidad nos revela una serie de aspectos esenciales que nos permite conocer la cantidad de semillas que están vivas o latentes, (ISTA, 2007). Existen diferentes pruebas que son independientes a la viabilidad de las semillas, entre ellas están la prueba de tetrazolio, prueba con fenolftaleína, prueba con rayos x, pruebas colorimétricas, etc.

2.3.7. Pruebas de viabilidad con tetrazolio

Según ISTA (2007) y MAPA (2009), indican que esta prueba determina rápidamente la viabilidad de semillas, particularmente de aquellas que presentan dormancia, de especies recalcitrantes y las que germinan lentamente en pruebas de rutina. Se determina la viabilidad de las semillas en muestras o individualmente cuando al final de la prueba de germinación ocurre un alto porcentaje de semillas no germinadas.

2.3.8. Principio

Dias y Silva (1998), Rodriguez *et al.* (2008) y Ruiz (2009), indican que la sal de tetrazolio es un indicador oxidante y reductor, y la coloración rojiza difundida en el tejido vivo es el resultado de la reducción de la sal por la acción enzimática, principalmente de la des-hidrogenación. La prueba está basada en la actividad de sistemas de enzimas, relacionadas con la actividad respiratoria de los sistemas biológicos, capaces de catalizar las reacciones durante el glicólisis y el ciclo de Krebs, tornándose iniciativas con la pérdida de viabilidad de los tejidos.

Al ser hidratadas las semillas, la actividad de las deshidrogenasas incrementa, resultando en la liberación de iones hidrógeno, lo que reduce a la solución de tetrazolio –2,3,5- triphenil tetrazolum chloride, incoloro- a formazán – color rojo-. El formazán tiñe a las células vivas de color rojo, en tanto que las muertas permanecen sin colorear como se muestra en la **figura 7**. La viabilidad de las semillas se determina en función del patrón de tinción del embrión y la intensidad de la coloración. Que una semilla sea viable, nos indica que es capaz de germinar y producir una plántula normal, sin embargo podría estar dormida, y en ese caso no germinaría inmediatamente (Ruiz, 2009).

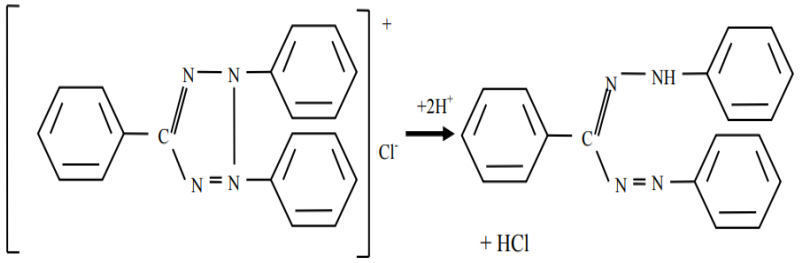


Figura 5. Esquema del proceso de oxidación del tetrazolio (ISTA, 2003)

2.3.8.1. Ventajas del ensayo topográfico

Según ISTA (2003), las ventajas que ofrece este método son las siguientes:

- Es un método relativamente rápido.
- El ensayo al tetrazolio sirve para medir la viabilidad de semillas, pero también se puede extender al análisis de vigor.
- Ofrece una referencia sobre el poder germinativo de una muestra de semillas.
- Este ensayo es útil para determinar, tras haber realizado la prueba de germinación, la causa que explica el por qué una muestra presenta un alto porcentaje de semillas que no han germinado. De este modo se puede conocer si las semillas presentan dormición, están inhibidas o por el contrario están dañadas y no germinarán nunca.
- El test del TZ también sirve para diagnosticar la causa del deterioro de las semillas ya sea por un secado inadecuado, plagas o lesiones mecánicas.
- Es aplicable a todo tipo de semillas.
- No depende de factores externos.
- Permite examinar características del vigor de las semillas tales como la integridad física de la semilla, la actividad de enzimas claves y la integridad de las membranas.

2.3.8.2. Desventajas del ensayo topográfico

Por otro lado, existen también ciertas desventajas que existe el llevar a cabo este tipo de ensayo, estas desventadas se resumen en los siguientes puntos:

- Un inconveniente de este análisis es que no detecta la presencia de hongos. Además, la determinación e interpretación de los resultados puede resultar subjetivas en algunos casos, (ISTA, 2003).
- Lo complicado de esta técnica es agrupar los grados de tinción, (Benito *et al.*, 2004).
- Rodriguez *et al.* (2008), mencionan que; hay que señalar que, en muchos casos, los resultados que se obtienen en condiciones controladas de laboratorio difieren de los obtenidos en el campo.
- Es un ensayo muy difícil de realizar cuando se trabaja con semillas pequeñas, como es el caso de muchas especies hortícolas, (Rodriguez *et al.*, 2008).

- Encontrar un protocolo adaptado a cada especie, de forma que las tinciones sean lo suficientemente homogéneas para asegurar una buena interpretación de los resultados (Espindola *et al.*, 2018).

2.3.9. Viabilidad

Cuando se habla de viabilidad de semillas en laboratorio se refiere a la estimación de la capacidad germinativa de un lote de semillas, sin importar que sean débiles o que no germinaran en condiciones de campo, así Rodriguez *et al.* (2008), presenta la relación entre viabilidad; germinación y latencia de la siguiente manera:

Semillas viables = Semillas germinadas + Semillas latentes

2.3.10. Procedimiento

Dias y Silva (1998), proponen los siguientes pasos:

- ❖ Preparación de la solución
- ❖ Obtención de la muestra
- ❖ Pre acondicionamiento
- ❖ Preparación de las semillas
- ❖ Coloración
- ❖ Evaluación

2.3.11. Vigor

El vigor de la semilla es la suma de todas las propiedades de la semilla que determinan el nivel de actividad y el papel de la semilla o el Lote de semillas durante la germinación y la emergencia de la plántula. Las semillas que se comportan bien en esos términos se denominan semillas de alto vigor y las que se comportan mal se llaman semillas de bajo vigor (ISTA, 2003).

El ensayo al tetrazolio sirve para medir la viabilidad de semillas, pero también se puede extender al análisis de vigor (ISTA, 1993) citado por (Rodriguez *et al.*, 2008).

2.3.12. Pruebas de viabilidad con tetrazolio en otras especies

Benito *et al.* (2004), realizó esta prueba bioquímica en semillas de pino piñonero, encontrando un tiempo óptimo de 12 horas de tinción, a una temperatura de 20º C - 25º C y una concentración de 0,1% de TZ.

Con un lote de 25 semillas, repetido 4 veces, a la solución de tinción concentrada al 1 % y al 0,50 % en cajas de Petri durante tiempos de exposición de 24 y 48 horas, a una temperatura de 30 °C y en ausencia de luz, Romero *et al.* (2020), menciona que dio como resultado un mayor porcentaje de vigor al implementar el tratamiento T3 (1 %, 48 h) con un 72 % y menor porcentaje de vigor para los tratamientos T1 (1 %, 24 h) y T4 (0,5 %, 48 h) con 2 % para ambos tratamientos.

Suarez *et al.* (2012), realizó la prueba del TZ en Pitahaya amarilla, en esta prueba se emplearon cinco concentraciones de tetrazolio (0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1%) con un pH de 7.02, dos tiempos de exposición (una hora y 24 horas) y, dos temperaturas, 40°C por una hora y, temperatura ambiente (22°C) para 24 horas. En las concentraciones 0.1% y 0.25% se logró una tinción tenue del eje embrionario y de los cotiledones, sin embargo, con concentraciones de 0.5%, 0.75 y 1.0% se alcanzó la tinción de todo el embrión, lo cual indica viabilidad.

2.3.13. Patrones topográficos

Se consideran patrones al conjunto de objetos representados en forma gráfica, un modelo de sucesión de elementos que se repiten (Pérez, J, 2021). El término topográfico se refiere al análisis detallado de la representación gráfica de la superficie de la tierra, tomando en cuenta sus características (Pérez, J, 2021).

De manera que; el término “patrones topográficos” aplicado a la prueba del tetrazolio en semillas, se refiere a una serie de imágenes de semillas que reaccionaron a la sal de tetrazolio de manera que se pueda interpretar a través del análisis de la superficie tomando en cuenta las regiones teñidas, de esta manera y siguiendo el método adecuado se podrá determinar si la semilla es o no viable.

3. MATERIALES Y MÉTODO

3.1. Localización

3.1.1. Ubicación Geográfica

La siguiente investigación se realizó en el laboratorio de control de calidad de semillas del Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal (INIAF), ubicado en la ciudad de La Paz, avenida Busch edificio Monterrey oficinas 3 y 4, a 16°29’45.7’’S y 68°07’17.3’’W, a 3600 m.s.n.m. (Calla, 2016).

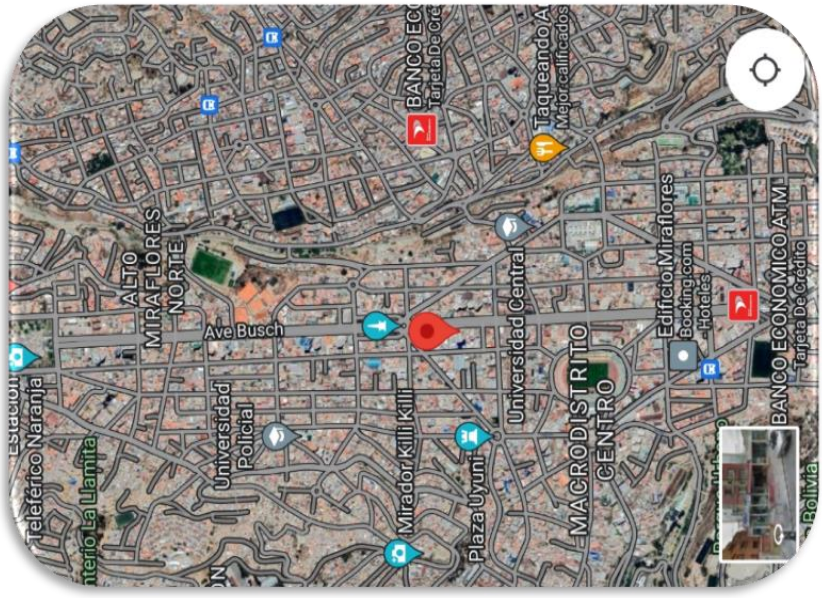


Figura 6. Ubicación del laboratorio INIAF (Google maps)

3.2. Materiales

3.2.1. Material de escritorio

- Laptop
- Cuaderno
- Lápiz
- Libreta de anotaciones
- Teléfono celular

3.2.2. Material de laboratorio

- Estereoscopio
- Vasos de precipitado
- Probeta graduada
- Embudos
- Escarpelo
- Pinza
- Varillas
- Placas Petri
- Bisturí
- Estilete
- Lupa
- Papel aluminio

3.2.3. Material químico

- 2-3-5 trifenil cloruro de tetrazolio
- Alcohol
- Agua destilada

3.2.4. Equipos de laboratorio

- pH metro
- Cámara germinadora
- Refrigerador

- Autoclave
- Destilador
- Balanza
- Cámara o campana de flujo laminar

3.2.5. Material biológico

- Semillas de Copoazú

3.3. Metodología

La investigación es de tipo experimental porque se probaron 3 temperaturas, 3 concentraciones y 3 tiempos de tinción bajo un diseño experimental.

3.3.1. Desarrollo del ensayo

El procedimiento consistió en evaluar la viabilidad de las semillas de copoazú con tetrazolio, probando 3 temperaturas, 3 concentraciones y 3 tiempos de tinción incluyendo por supuesto a los tratamientos extra (testigos). Los resultados encontrados tuvieron que ser validados mediante la comparación del porcentaje de viabilidad y el porcentaje de germinación, ambas pruebas se iniciaron el mismo día como lo recomienda el ISTA (2007).

3.3.1.1. Medidas biométricas previos al ensayo (fruto, semilla y embrión)

- **Peso del fruto, cáscara, pulpa y semillas**

Pese a que dentro de nuestros objetivos no se menciona la evaluación de biometría del fruto y semilla del copoazú, se hizo la medición de estas variables (Figura 7) a fin de contar con datos reales dentro del ensayo. Se realizó el cálculo promedio del peso, longitud y diámetro del fruto, peso y grosor del epicarpio (cáscara), peso de la pulpa, peso, longitud, ancho y grosor de la semilla, finalmente se realizó la medición de la longitud del embrión.

Figura 7. Pesaje del fruto, pulpa y semillas de copoazú.

Para realizar un ensayo bioquímico al tetrazolio, se debe tener bien identificado la estructura de la semilla en especial del embrión, para ello se extrajo la semilla de copoazú, se diseccionó de forma transversal y longitudinal observando sus estructuras, para una mejor observación se usó el estereoscopio (figura 8). Para tener certeza de estas estructuras se germinó algunas semillas para describir de dónde emerge la plúmula y la radícula principalmente (figura 9). En el siguiente cuadro se resume paso a paso la germinación de la semilla y las estructuras embrionales que dan origen a una nueva planta.

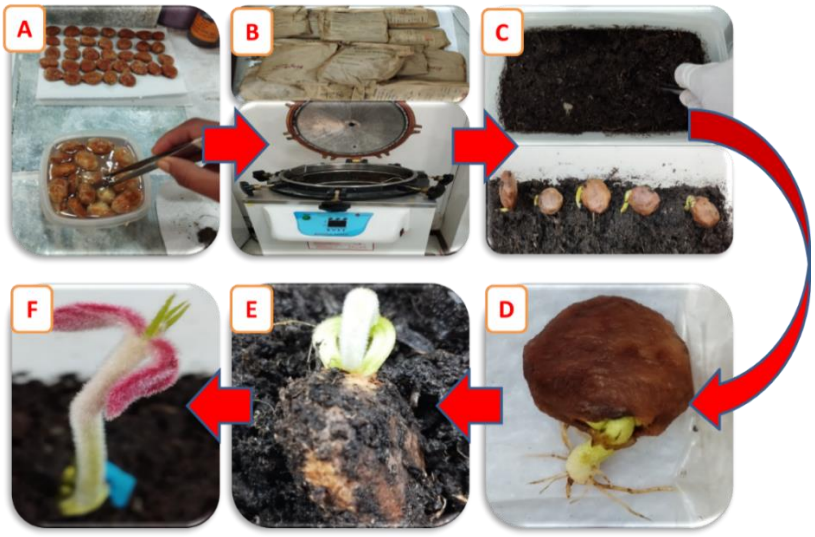


Figura 8. Proceso de germinación de semillas de copoazú
A) Semilla despulpada B) Sustrato esterilizado C) Semillas sembradas en sustrato D) Semilla con radícula emergida E) Semilla de copoazú con la radícula y la plúmula emergida F) Plántula normal de copoazú

Teniendo en conocimiento la estructura de la semilla que da origen a la raíz (radícula), se hizo el uso de una semilla que no iba a germinar en una planta normal, esto con fines de tener certeza de la estructura que da origen al tallo y por ende a las primeras hojas de la

planta (plúmula) dentro del embrión. A continuación, en la figura 9 se muestra los cortes realizados para la verificación.

Figura 9. Observación detallada de la anatomía del embrión A) Semilla de copoazú con radícula elongada. B) Corte del endospermo para una mejor visibilidad del embrión. C) Extracción del embrión con la radícula elongada. D) Vista en estereoscopio de la plúmula

3.3.1.2. Acondicionamiento del ambiente de la investigación

Para determinar la viabilidad de las semillas, se empleó la prueba topográfica de tetrazolio, método bioquímico el cual permite establecer diferentes grados de tinción en regiones y estructuras esenciales del embrión, para asociarlos con presencia o ausencia de viabilidad.

- ✓ **Temperatura**

Según Villachica (1996), la temperatura media del cultivo de copoazú varía entre 21,6 a 27,5 ºC. Por otro lado, Pro Tempore y FAO (1999), mencionan que, las medias mensuales de las temperaturas máximas se sitúan entre los 28,6 °C y 35,6 °C. En ensayos similares a la presente investigación como en el caso de Amaya y Motta (2008) se determinó 30 ºC en semillas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*). Por otro lado, Mendoza (2009) citado por Perez (2018) al igual que Delouche *et al.* (1971), utilizaron una temperatura de 40 °C en semillas de algodón (*Gossipium spp*), sin embargo, al momento del acondicionamiento 40 °C se pudo observar que era una temperatura muy elevada.

A partir de toda esta información y debido a que todas las muestras de semilla que se remiten al laboratorio se realizan las pruebas de viabilidad y germinación a 25 ºC, se determinó las siguientes temperaturas; 25 °C como primera temperatura, 30 °C para los tratamientos extra (testigos) y 35 °C como segunda temperatura manteniendo un rango de 5 °C por cada tratamiento. Al igual que los trabajos mencionados el ensayo se lo sometió en total oscuridad de manera que la solución pueda hacer efecto y actuar conforme a su principio.

- ✓ **Acondicionamiento de las cámaras automatizadas**

El laboratorio cuenta con cámaras de germinación, una ya calibrada y automatizada a 25 ºC. Se hizo una limpieza y espacio para los tratamientos del ensayo. Para los tratamientos sometidos a 35 ºC se instaló otra cámara de germinación, de igual manera se realizó la limpieza para la posterior implementación del ensayo. En el caso de los testigos, para los tratamientos T0, T1 y T2 se acondicionó una tercera cámara de germinación a 30 ºC (figura 10) según se mencionó con anterioridad.

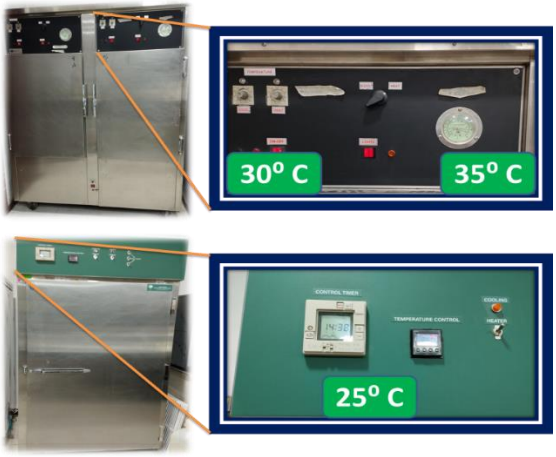


Figura 10. Distribución de las cámaras de germinación conforme a las temperaturas

- ✓ **Concentración de tetrazolio (Preparación de la solución)**

La concentración de la disolución puede variar entre 0,1 y 1,0 por ciento, siempre y cuando el pH que se obtenga esté comprendido entre 6,5 y 7,5 (Rodriguez *et al.*, 2008). Una de las especies de referencia fue la del cacao (*Theobroma cacao*), con tinción cuya concentración se realizó al 0,10 % (López y Gil, 2017), sin embargo, se puede observar un poco de dificultad al momento de la interpretación y tomando en cuenta el tiempo de tinción fue motivo por el cual se optó por tomar 0,15 % de TZ como primera concentración.

También se tomó ejemplos en otras especies, tal es el caso de la prueba topográfica al TZ en algodón (*Gossypium spp*), los mejores resultados se dieron en concentraciones de 0,75 % y 1,00 % por 14 horas siendo las concentraciones 1,25 y 1,50 inadecuados ya que dificulta su interpretación (Perez, 2018). Debido a que los tiempos de tinción iban a ser mayores, en la presente investigación se optó por tomar una concentración de 0,30 % como segunda concentración.

Para determinar la concentración de TZ de los tratamientos extra se tomó como referencia el trabajo Amaya y Motta (2008) quienes utilizaron una concentración de 0,50 % de TZ obteniendo buenos resultados en términos de viabilidad. Debido a lo mencionado se tomó como concentración de los tratamientos extra (control o testigo) de la presente investigación 0,50 % de TZ.

Otra especie que se consideró por el tamaño de la semilla pese a no pertenecer ni al género ni familia del copoazú fue la realizada por Camacho *et al.* (2017), en su ensayo topográfico en semillas de *Cedrela odorata* L. utilizó concentraciones de 0,50, 1,00, y 1,50 % por dos tiempos que fueron dos y tres horas, en la cual 0,5 % por dos y tres horas dio mayor porcentaje de viabilidad. En base a estas referencias y tomando en cuenta el tamaño de la semilla de copoazú, se optó por tomar las siguientes concentraciones: 0.30 %, 0.15 % y 0.50% (tratamientos extra), diluyendo con agua destilada bajo las siguientes cantidades:

Cuadro 4. Cantidad de sal de TZ a utilizarse por cada 100 ml de solución

CONCENTRACIÓN	CANTIDAD DE TETRAZOLIO	CANTIDAD DE AGUA DESTILADA
0.15 %	0.15 g.	100 ml.
0,30 %	0,30 g.	100 ml.
0,50 %	0,50 g.	100 ml

Nota. La concentración de 0,5 % corresponde al testigo,

La preparación de las soluciones se realizó en base al cuadro 4, se utilizó 100 ml de solución para cada repetición, 300 ml por tratamiento. A continuación, se muestra un esquema de cómo se realizó la preparación de la solución (figura 11). Una vez preparado la solución se debe almacenar en un lugar oscuro hasta el momento de su utilización, la manipulación del reactivo de debe realizar con guantes, debido a su toxicidad.

Figura 11. Preparación de la solución de tetrazolio. A) 2-3-5 trifenil cloruro de tetrazolio. B) Pesaje del tetrazolio. C) Dilución de la sal de tetrazolio en agua destilada. D) Solución de tetrazolio preparada y diluida.

- ✓ **Tiempo de tinción**

Para determinar el tiempo de tinción se tomó como referencia nuevamente a Amaya y Motta (2008) con 24 horas de tinción. Por otro lado, Sanchez *et al.* (2003), realizó la prueba topográfica en copoazú al 1,00 %, no obstante, no menciona el tiempo. Romero *et al.* (2020) en su trabajo de investigación en semillas de frijol optaron por un tiempo de 48 horas, tiempo mediante el cual obtuvo mejores resultados. En base a los antecedentes ya mencionados, tomando en cuenta el tamaño de la semilla de copoazú y la concentración de los tratamientos respecto al TZ, se optó por tomar 24, 48 y 72 horas de tinción, 24 horas para los tratamientos extra también.

3.3.1.3. Muestra de trabajo

Perez (2018), tuvo un total de 70 tratamientos con 3 repeticiones de las cuales cada repetición tuvo un total de 10 embriones, correspondientes a 10 semillas de algodón (*Gossypium spp.).* En el caso de semillas de copoazú realizado por Sanchez *et al.* (2003), quien analizó 20 semillas por cada repetición sumando un total de 40 semillas. En semillas de cacao, mismo género del copoazú realizado por López y Gil (2017), se emplearon 10 semillas al igual que en el caso del algodón ya mencionado. Conforme a estas referencias, al tamaño de la semilla y al ser de tipo recalcitrante se toma la decisión de optar por 20 semillas por tratamiento.

El siguiente cuadro refleja la cantidad exacta que se empleó para el presente trabajo.

Cuadro 5. Número de semillas por tratamiento

TRATAMIENTO	FACTORES	N.º DE SEMILLAS	REPETICIONES
1	A C1 t1	20 semillas	-
2	A C1 t2	20 semillas	-
3	A C1 t3	20 semillas	-
4	A C2 t1	20 semillas	-
5	A C2 t2	20 semillas	-
6	A C2 t3	20 semillas	-
7	B C1 t1	20 semillas	-
8	B C1 t2	20 semillas	-
9	B C1 t3	20 semillas	-

10	B C2 t1	20 semillas	-
11	B C2 t2	20 semillas	-
12	B C2 t3	20 semillas	-
T0	(testigos)	20 semillas	3 repeticiones
T1	(testigos)	20 semillas	3 repeticiones
T2	(testigos)	20 semillas	3 repeticiones
TOTAL		**420 SEMILLAS**	

Nota. Los testigos fueron empleados bajo 30 °C, 0,50 % de TZ y24 horas de tinción con 3 repeticiones cada uno.
A= 25 °C
B = 35 °C
C1= 0,15 % TZ
C2= 0,30 % TZ
t1= 24 horas
t2= 48 horas
t3= 72 horas

- **Obtención del fruto**

Los frutos fueron colectados en parcelas de copoazú en el municipio de Entre Ríos del departamento de Cochabamba, se colectó 30 frutos de copoazú de manera que pueda ser suficiente para efectuar el ensayo. En la figura 12 se muestra la planta del cultivo de copoazú del cual se obtuvo las semillas.

Figura 12. Árbol de copoazú del cual se obtuvo la semilla.

3.3.1.4. Preparación de las semillas

- ✓ **Despulpado del fruto**

Se comenzó con el pesaje de los frutos seguido de la extracción del epicarpio o cáscara, con la ayuda de un cuchillo de buen tamaño tipo sierra se cortó de manera transversal

separando la pulpa en un recipiente y con la ayuda de unas tijeras debidamente desinfectadas se procedió a quitar la pulpa de la semilla (despulpar) como se muestra en la figura 13, se hace uso de las tijeras debido a que la pulpa se encuentra fuertemente adherida a la semilla por ello se realizó cuidadosamente este proceso.

Figura 13. Proceso de despulpado del fruto de copoazú para la obtención de la semilla A) Pesaje del fruto de copoazú. B) Separación de epicarpio de la pulpa. C) Extracción de la pulpa y semilla. D) Separación de la semilla y la pulpa con ayuda de tijeras.

- ✓ **Contenido de humedad**

Por el comportamiento recalcitrante tropical de las semillas pierden rápidamente el poder germinativo, especialmente expuestas a humedad relativa y/o temperaturas bajas (Villachica, 1996). La medición de contenido de humedad en un proceso que se realiza con fines de conocimiento sobre el estado de las semillas previo a las pruebas de calidad.

Las semillas fueron sometidas al horno con 120 ºC por 17 horas, se realizó el pesaje final y se hizo el cálculo respectivo (figura 14). El contenido de humedad en la semilla es un factor muy influyente en la viabilidad de las semillas y más al tratarse de semilla recalcitrante, cualquier cambio de humedad en este tipo de semillas significa una varianza en la viabilidad y por ende en la germinación al igual que cambios en la temperatura.

Figura 14. Pesaje inicial y final de cinco semillas para el cálculo de humedad.

Se hizo la medición de humedad de las semillas realizando el pesaje total de 5 semillas con 3 repeticiones a través de la siguiente fórmula:

$$H\% = \frac{(Pi - Pf) * 100}{Pi}$$

Dónde:

H% =Contenido de humedad de la semilla.

Pi = Peso inicial

Pf = Peso final

- ✓ **Remoción de la cubierta seminal (tegumento)**

En algunas especies es necesario remover la cubierta de la semilla y también otras membranas para permitir la absorción del tetrazol (Delouche *et al.*, 1971). Sanchez *et al.* (2003), no menciona como se hizo la preparación de la semilla para el análisis, no obstante, se vio pertinente remover la semilla a causa de su consistencia y al quedar con restos de pulpa adherida al tegumento, la remoción se hizo de manera manual y con fines de facilitar la imbibición por parte de la semilla como se ilustra en la figura 15.

Posterior a la remoción se colocó la semilla en agua destilada antes de ser sometido a la solución de tetrazolio y se realizó dos enjuagues previos.

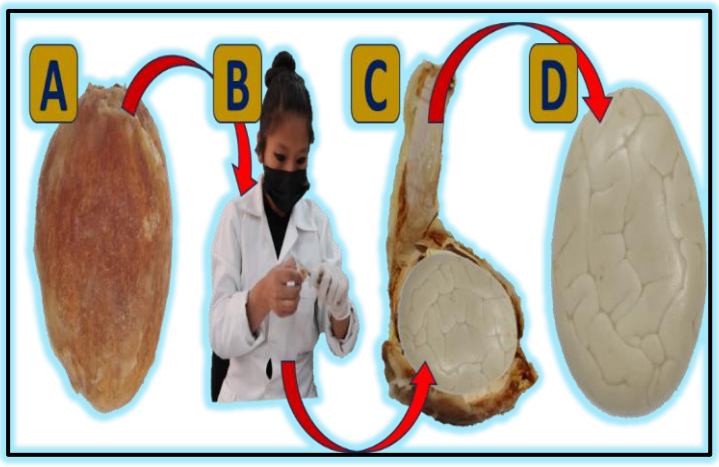


Figura 15. Remoción de la cubierta seminal A) semilla con pulpa o mucílago removido, B) Remoción manual de la cubierta seminal, C) Semilla con el tegumento semi extraido, D) Semilla con el tegumento totalmente extraido

- ✓ **Disección de la semilla (tratamientos extra)**

Delouche *et al.* (1971) no solo menciona realizar remoción del tegumento, sino realizar un corte a través del embrión desechando la otra mitad, una vez realizado el corte se colocan rápidamente en la solución. Las semillas de copoazú al ser recalcitrante, presenta una oxidación rápida, debido a ello no era oportuno realizar el corte a través del embrión, por lo tanto, en los tratamientos extra T0 y T2 se realizaron cortes longitudinales sin dañar el embrión a excepción del tratamiento T1 cuyos cortes fueron en forma de V debajo del embrión (doble corte) como se muestra en la figura 16.

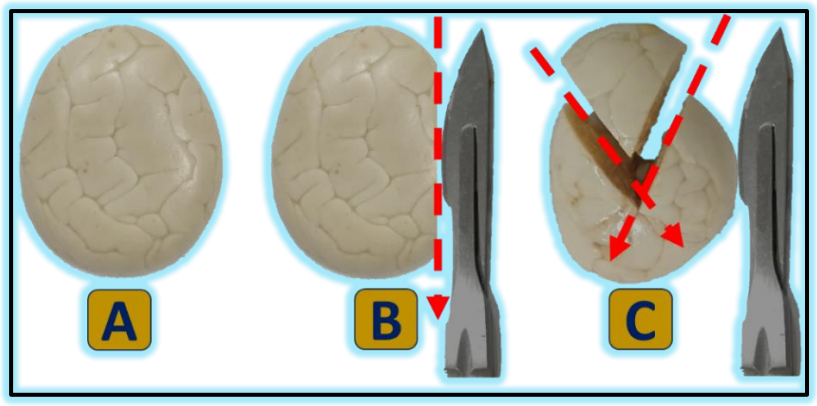


Figura 16.Preparación de las semillas A) Semilla sin corte B) Semilla con un corte longitudinal C) Semilla con doble corte

Los primeros 12 tratamientos se los realizó con semillas cuya cubierta seminal fueron removidas mas no se realizó ningún tipo de corte.

- ✓ **Extracción del embrión**

Se tomó como referencia a su similar más cercano el cacao (*Theobroma cacao*) al pertenecer al mismo género, debido también a sus similares características en cuanto a estructura de la semilla, López y Gil (2017), analizaron las semillas de cacao enteras incluso con la cubierta seminal. Por otro lado, Perez (2018), analizó las semillas de algodón sin extraer el embrión (semilla entera), contrario al trabajo de Calla (2016), quien realizó el análisis en semillas de café extrayendo los embriones de la semilla.

La estructura de las semillas de cacao, algodón y copoazú son similares debido a que pertenecen a la misma familia, incluso en el caso del cacao pertenece al mismo género, el embrión de estas semillas se encuentra conectado a los cotiledones de manera que es

imposible separarlo sin causar daños mecánicos, por lo tanto, se consideró someter toda la semilla sin el tegumento en la solución de tetrazolio.

- ✓ **Imbibición en solución de tetrazolio**

Debido a la estructura y gran contenido de humedad por parte de la semilla, no requiere previa imbibición en agua destilada como en semillas de Guayaba (Guebara *et al.*, 2020) y pitahaya (Espindola *et al.*, 2018). Al igual que López y Gil (2017) y Perez (2018), no se realizó previo remojo, de acuerdo a los tratamientos establecidos se procedió a someter las semillas en la solución de TZ distribuyéndolos de acuerdo a los factores empleados mediante el diseño experimental, todos los tratamientos en absoluta oscuridad, cubriendo los recipientes con papel aluminio de manera que no quede expuesta a la luz, permitiendo el proceso de tinción.

3.3.1.5. Tinción o coloración

Posterior a la preparación de la semilla, se las introdujo en la solución de TZ, posteriormente fueron llevadas a una cámara automatizada con temperatura constante dependiendo los tratamientos 25°, 30° (testigos) y 35 °C, en ausencia de luz la solución de TZ cumplió con su reacción con el tejido de la semilla, para esto cada recipiente con la solución y las semillas se forraron con papel aluminio de manera que no penetre ni un mínimo rayo de luz, finalmente fueron codificados de acuerdo a los tratamientos de esta manera se facilita la evaluación o interpretación.

3.3.1.6. Germinación

La prueba de germinación re realizó de manera convencional con fines comparativos de esta manera aportar con información que coadyuve en la generación de una normativa técnica para semillas de copoazú.

- ➢ **Despulpado y acondicionamiento de la semilla**

Al igual que el ensayo bioquímico al TZ, primero se quitó el epicarpio, se despulpó con la ayuda de tijeras debidamente desinfectadas, para proceder con la siembra se desinfectó la semilla con dióxido de cloro al 2,00 % para evitar cualquier tipo de contaminación dentro de las bandejas (figura 17). En cuanto a Tª se tomó las mismas que en el ensayo bioquímico 25°, 30° (testigos) y 35 °C.

Figura 17. Proceso de despulpado del copoazú para la siembra A) Despulpado de la semilla. B) Enjuague de las semillas con dióxido de cloro y agua destilada. C) Secado de las semillas previo a la siembra.

- **Siembra de las semillas en sustrato**

Las semillas fueron sembradas de forma convencional en un sustrato conformado por turba y tierra negra estéril, en una relación de 60 y 40 respectivamente y fueron evaluados a partir de las primeras semillas germinadas hasta contar con más del 50 % de semillas germinadas, para determinar la primera y última evaluación esto con el fin de comparaciones finales con respecto a viabilidad de la semilla (figura 18).

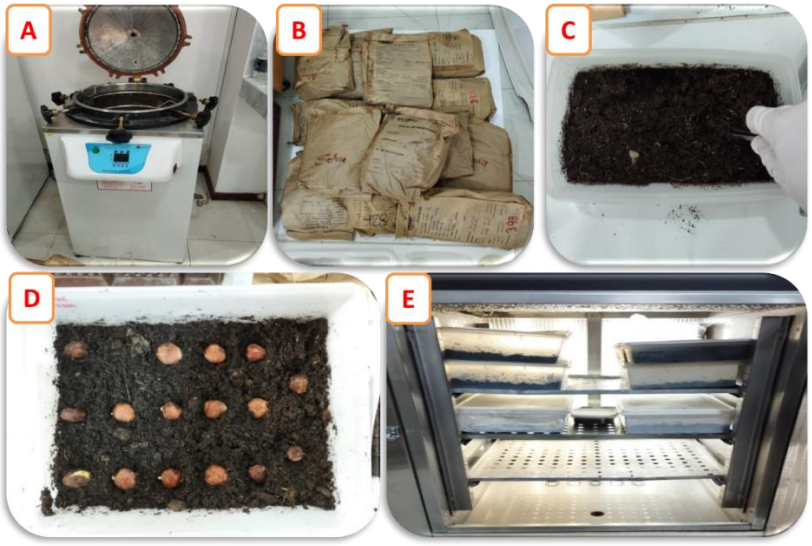


Figura 18. Esterilización del sustrato y siembra de las semillas de copoazú. A) Autoclave vertical automatizado. B) Sustrato esterilizado (tierra negra y turba). C) Sustrato humedecido a Capacidad de campo. D) Siembra de las semillas (20 semillas por bandeja). E) Semillas sembradas sometidas a temperatura controlada

La siembra se realizó en las mismas T^{as} del ensayo bioquímico 25 ºC, 35 ºC y para el testigo 30 °C, se sembró 20 semillas por bandeja con 2 repeticiones cada una como se detalla en el cuadro 6:

Cuadro 6. Distribución de prueba de germinación

SEMILLAS	TEMPERATURA (ºC)	REPETICIONES
20	25	3
20	35	3
20	30	3 (testigos)
	TOTAL	180 semillas

3.3.1.7. Deterioro y pérdida de viabilidad

Para determinar la causa de pérdida de viabilidad, se comparó los resultados de viabilidad de semillas recién cosechadas, semillas empleadas a los tres días de su cosecha y se evaluó semillas a los 4 días posterior a la cosecha, con fines de determinar la perdida de viabilidad en las semillas analizadas. Autores como Delouche *et al.* (1971) mencionan que las semillas recalcitrantes tropicales no toleran cambios de temperatura y/o humedad dentro y fuera de la semilla.

Figura 19. Semilla fresca y semilla sometida a bajas temperaturas en tetrazolio

Para comprobar la perdida de viabilidad por bajas temperaturas se sometió semillas que fueron almacenados a bajas temperatura y semillas que se mantuvieron a una temperatura de semilla fresca como se muestra en la figura 19.

3.3.1.8. Mapa topográfico de viabilidad

Con los resultados obtenidos mediante los diferentes análisis, se genera un mapa topográfico al tetrazolio. Se analiza cada semilla con embrión teñido especialmente el eje embrionario, con los resultados de las semillas evaluadas se generará un mapa con las diferentes categorías aclarando si es viable o no viable, de acuerdo a las regiones con presencia de coloración y tejidos sin coloración (muerto) se las fue clasificando en las diferentes categorías.

3.3.1.9. Protocolo de viabilidad

Finalmente, después del análisis de los resultados se generará un protocolo de viabilidad de semillas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*) mediante el ensayo topográfico al tetrazolio, indicando temperaturas, concentraciones de TZ, tiempos de tinción y método de preparación de las semillas.

3.3.2. Diseño experimental

Para la evaluación de este estudio se realizó un Diseño Completamente al Azar con arreglo trifactorial (3 x 3), con tratamientos extra (testigos), (Ochoa, 2016).

Por lo que el modelo lineal aditivo es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_j + \beta_i + Ç_k + (\beta\alpha)_{ij} + (Ç\alpha)_{kj} + (\beta Ç)_{jk} + (\alpha\beta Ç)_{ijk} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk}= Una observación cualquiera de la variable de respuesta.

μ = Media general.

α_j = Efecto fijo de la i-ésima concentración de tetrazolio.

β_i = Efecto de la j-ésima temperatura de tinción.

$Ç_k$ = Efecto del k-ésimo tiempo de tinción.

$(\beta\alpha)_{ij}$ = Efecto de la interacción de la i-ésima concentración de tetrazolio y la j-ésima temperatura de tinción.

$(Ç\alpha)_{kj}$ = Efecto de la k-esimo tiempo de tinción y la i-ésima concentración de tetrazolio.

$(\beta Ç)_{jk}$ = Efecto de la j-ésima temperatura y la k-ésimo tiempo de tinción.

$(\alpha\beta Ç)_{ijk}$= Efecto de la interacción de la i-ésima concentración de tetrazolio, j-ésima temperatura de tinción y k-ésimo tiempo de tinción.

ε_{ijk} = Efecto aleatorio del error experimental.

3.3.2.1. Factores de estudio

Los factores de estudio fueron:

- Factor A = Temperatura de tinción

A_1 = 25 ºC

A_2 = 35 ºC

- Factor B = Concentración de Tetrazolio

B_1 = 0,15 %

B_2 = 0,30 %

- Factor C= Tiempos de tinción

C_1= 24 horas

C_2= 48 horas

C_3= 72 horas

- Testigos (Tratamientos extra)

T_0= Semilla con corte longitudinal (30 ºC, 0,50 % tetrazolio por 24 horas)

T_1= Semillas con doble corte en forma de v debajo del embrión y sin dañarlo (30 ºC, 0,50 % tetrazolio por 24 horas)

T_2= Semillas con corte longitudinal (30 ºC, 0,50 % tetrazolio por 24 horas), recién cosechado

3.3.2.2. Formulación de tratamientos

Los testigos fueron incluidos con fines de una mejor comparación y toma de decisiones en base a los resultados que se obtengan, al tratarse de un fruto tropical la obtención del material biológico (traslado vía terrestre) demoró un total de 3 días en llegar hasta el laboratorio. Para realizar una buena comparación y según las referencias ya mencionadas anteriormente se realizó la comparación con frutos recién cosechados, de manera que se realizó la prueba en el lugar de producción (T2).

A continuación, se detalla los tratamientos con las combinaciones de diferentes factores de estudio.

Cuadro 7. Combinación de los factores de estudio para los tratamientos.

N.º de Tratamiento	Temperatura	Concentraciones	Tiempos de tinción (horas)	Combinaciones
1	25 ºC (A)	0,30 % (C1)	24 (t1)	T1 C1 t1
2	25 ºC (A)	0,30 % (C1)	48 (t2)	T1 C1 t2
3	25 ºC (A)	0,30 % (C1)	72 (t3)	T1 C1 t3
4	25 ºC (A)	0,15 % (C2)	24 (t1)	T1 C2 t1
5	25 ºC (A)	0,15 % (C2)	48 (t2)	T1 C2 t2
6	25 ºC (A)	0,15 % (C2)	72 (t3)	T1 C2 t3
7	35 ºC (B)	0,30 % (C1)	24 (t1)	T2 C1 t1
8	35 ºC (B)	0,30 % (C1)	48 (t2)	T2 C1 t2
9	35 ºC (B)	0,30 % (C1)	72 (t3)	T2 C1 t3
10	35 ºC (B)	0,15 % (C2)	24 (t1)	T2 C2 t1
11	35 ºC (B)	0,15 % (C2)	48 (t2)	T2 C2 t2
12	35 ºC (B)	0,15 % (C2)	72 (t3)	T2 C2 t3
13	30 ºC (T0)	0,50 % (T0)	24 (T0)	T 1
14	30 ºC (T1)	0,50 % (T1)	24 (T1)	T 2
15	30 ºC (T2)	0,50 % (T2)	24 (T2)	T 3

NOTA. - Cada tratamiento contó con 20 semillas y los testigos con 3 repeticiones de 20 semillas cada una.

3.3.3. Variables de respuesta

3.3.3.1. Tinción de las estructuras esenciales del embrión

Estas variables se tomaron en cuenta para poder comparar con la germinación o no de las semillas, para determinar las regiones del eje embrionario con y sin tinción, de manera que se pueda interpretar la diferencia e importancia de cada una de las estructuras del embrión específicamente del eje embrionario. Esta variable se evaluó mediante la presencia o no de coloración en cada una de las estructuras esenciales del embrión.

3.3.3.2. Tejido vivo del eje embrionario

Esta variable se evaluó en términos de porcentajes, viene como la suma de la anterior variable, mediante esta variable se tuvo conocimiento de la actividad del TZ con los tejidos vivos del eje embrionario. La importancia del método de preparación de la semilla se reflejó en esta variable de medición.

3.3.3.3. Tonalidades y patrones de tinción

Según el estado de los embriones se vieron reflejados en la tinción de las mismas, es decir, el tejido vivo del eje embrionario presento coloración y el tejido muerto del eje embrionario no presentó ninguna coloración, así también se vieron tinciones parciales. De acuerdo a estas descripciones se evaluaron cuatro tonalidades que se representaron bajo las siguientes categorías:

0 = no hubo tinción
1 = muy leve
2 = leve
3 = medio
4 = intenso

3.3.3.4. Porcentaje de viabilidad

Los datos de viabilidad van de la mano con la variable porcentaje de tejidos vivos del embrión, esto debido a que, las semillas con eje embrionario que presentan el 100 % del eje embrionario con coloración indican viabilidad en la semilla y se las contabilizó el total en términos de porcentaje bajo las siguientes codificaciones:

V = Viable

NV = No viable

Al finalizar la evaluación se contabilizo el total de semillas viables y no viables mediante la siguiente formula:

$$\%\ de\ Viabilidad = \frac{\text{Semillas viables}}{\text{Semillas sometidas}} x\ 100$$

3.3.3.5. Categoría

Esta variable de evalúa para generar el mapa topográfico de viabilidad de la semilla de copoazú, los patrones que más se repitieron respecto a la intensidad de la coloración o tinción, debido a que algunas semillas de acuerdo a las diferentes temperaturas, concentraciones de tetrazolio y tiempos de tinción muestran diferentes tonalidades, las cuales determinan la presencia o ausencia de viabilidad en la semilla de acuerdo a las regiones teñidas.

3.3.4. Evaluación para la viabilidad

Culminando los tiempos de tinción, se retiraron los envases con los tratamientos y enjuagaron con abundante agua puede ser de grifo no es necesario que sea destilada a fin de eliminar todo exceso de la solución. Para la evaluación de las semillas de los tratamientos 1 al 12 se realizaron cortes longitudinales a través del embrión de la semilla de manera que queden visibles las partes teñidas del embrión para poder realizar la evaluación a cada una de las semillas como se muestra a continuación:

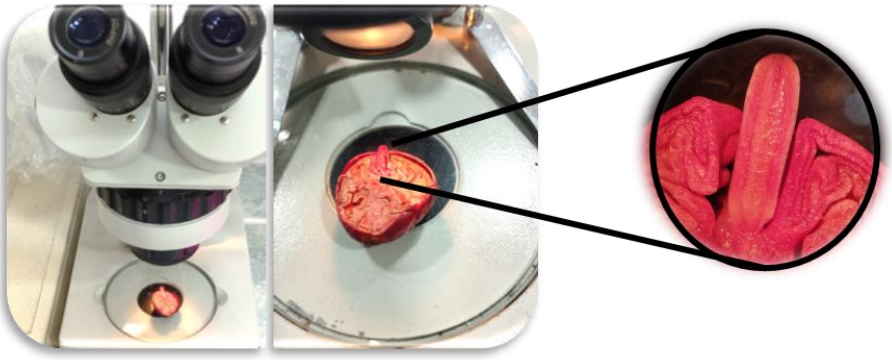


Figura 20. Evaluación visual del embrión a través del estereoscopio.

En la figura 20 se muestra cómo se realizó el análisis topográfico de las estructuras y su reacción a la solución de Tetrazolio se realizó con un estereoscopio para tener mayor visibilidad en el momento de evaluar de esta manera se facilita la interpretación de los resultados.

3.3.5. Evaluación para germinación

Se hizo el conteo del número de semillas que desarrollaron una plántula. La primera evaluación se realizó cuando se observó por lo menos un 50% de semillas germinadas. El porcentaje de germinación se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\%\ de\ Germinación = \frac{\text{Semillas germinadas}}{\text{Semillas sembradas}}\ x\ 100$$

3.3.6. Análisis estadístico

3.3.6.1. Análisis de varianza y pruebas de medias

Se utilizó análisis de varianza y pruebas de comparaciones múltiples de Duncan con un nivel de significancia α del 5 % para detectar diferencias entre los promedios del porcentaje

de tejidos vivos del eje embrionario y el porcentaje de tejidos muertos del eje embrionario, (TVEE y TMEE), mediante el uso de Infostat (Di Rienzo *et al*., 2016).

3.3.6.2. Distribución de frecuencias

Se realizó un análisis mediante distribución de frecuencias para las variables cualitativas presencia de radícula teñida (PRT), presencia de radícula sin teñir (PRST), presencia de hipocótilo teñido (PHT), presencia de hipocótilo sin teñir (PHST), presencia de epicótilo teñido (PET), presencia de epicótilo sin teñir (PHST), presencia de plúmula teñida (PPT), presencia de plúmula sin teñir (PPST), tonalidad de patrones de tinción (TPT), y viabilidad de semillas, viables (V) y no viables (NV).

3.3.6.3. Análisis para la pérdida de viabilidad

Mediante la hoja de cálculo Excel se realizó grafico de barras para la pérdida de viabilidad de la semilla, porcentaje de germinación y la comparación viabilidad y germinación.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estructura del fruto, semilla y embrión del copoazú (*Theobroma grandiflorum*)

En el proceso del trabajo en laboratorio y gabinete se tuvo dificultad en la identificación de la estructura de copoazú como tal, es decir, para interpretar la viabilidad de las semillas fue básicamente primordial. Se comenzó con la identificación de la estructura del fruto el cual se tomó de ejemplo a su similar el cacao.

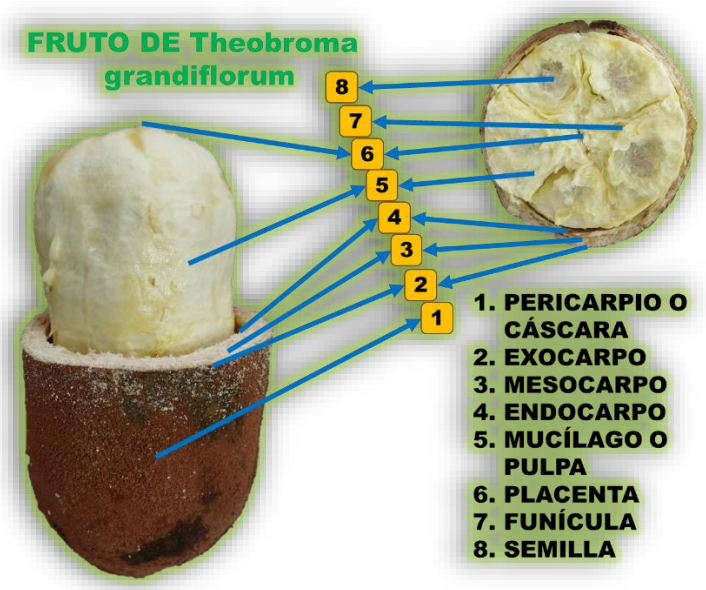


Figura 21. Estructura del fruto de copoazú (*Theobroma grandiflorum*)
Fuente. Elaboración propia

Mediante la constante y ardua revisión bibliográfica, basándonos en el trabajo de Venegas, (2017) y, a través de la germinación se pudo identificar la anatomía de la semilla (figura 21) y principalmente del embrión (figura 23). La semilla se encuentra fuertemente unida al mucílago o pulpa del fruto, el tegumento (testa y tegumen) es de un promedio de 2 mm de grosor, el conjunto cotiledones-embrión está cubierta con una membrana muy delgada y transparente cuyo nombre se, el endospermo se encuentra en esta etapa de la semilla, el embrión mide de 6,5 a 12 mm se encuentra ubicado en un extremo de la semilla, se encuentra unida a los cotiledones, quien sirve de reserva las primeras semanas de fase de germinación.

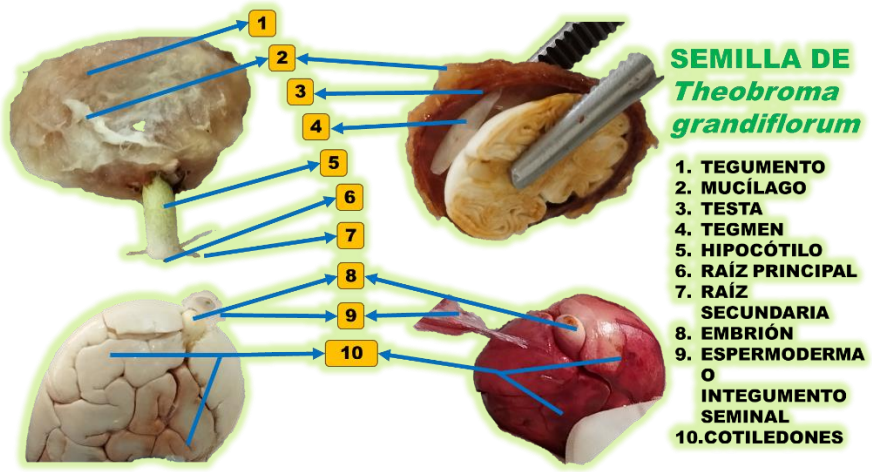


Figura 22. Estructura de la semilla de copoazú (*Theobroma grandiflorum*)

La figura 22 demuestra una a una la estructura de la semilla de copoazú comenzando del tegumento que consta de dos sub capas, tegmen y testa, el tegumento se encuentra fuertemente adherida con restos de pulpa o mucilago. Es sistema radicular es la primera en emerger, posterior a ello comienza el desarrollo del sistema caulinar.

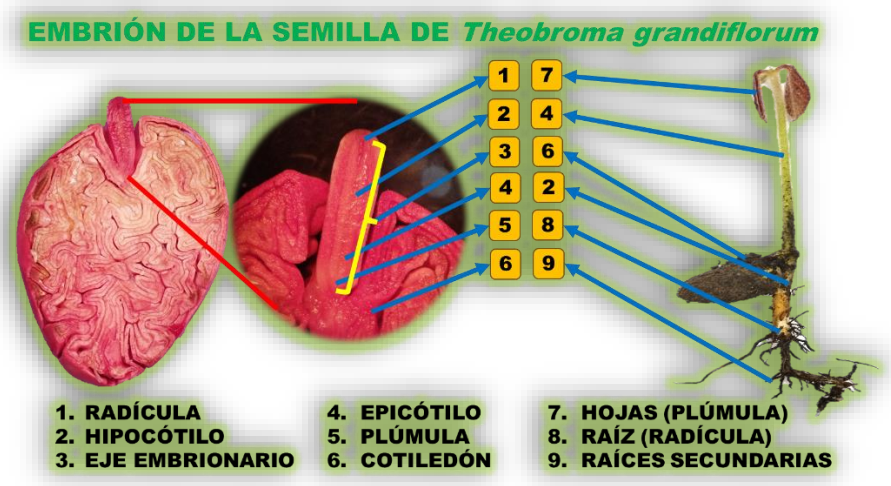


Figura 23. Estructura del embrión de la semilla de copoazú (*Theobroma grandiflorum)*

En la figura 23 se muestra la estructura del embrión, mismas que dan origen a las diferentes estructuras de una planta verdadera y completa, cabe recalcar que, a diferencia de su similar más cercano que es el cacao que es de germinación epigea, el copoazú es de germinación hipogea, es decir, los cotiledones se quedan en el suelo emergiendo solamente el eje caulinar.

Según Bedoya y Mejia (2003), en su clasificación de las semillas de copoazú según el tamaño, las semillas que se utilizaron en la presente investigación pertenecerían al tamaño mediano presentando un promedio de ancho 2,3 cm y de largo 2,7 cm, a estos datos le agregamos el peso que en promedio fue de 3,5 g y embrión de 9,4 mm.

4.2. Tinción de las estructuras esenciales del embrión

Dentro de la semilla se encuentran estructuras que dan origen a una nueva planta: el endospermo, que en la etapa madura de la semilla se encuentra ausente, los cotiledones se encuentran unidas al embrión y sirven de reserva de nutrientes en las primeras semanas de vida en la planta, finalmente la parte más esencial es el eje embrionario ubicado dentro del embrión, dentro de este eje se encuentran la radícula, hipocótilo, epicótilo y la plúmula, por lo tanto, el resultado de la actividad del TZ en el tejido de estas estructuras es clave al momento de determinar la viabilidad o no de la semilla.

Cuadro 8. Porcentajes de tinción en radícula, hipocótilo, epicótilo y plúmula

	Porcentaje de tinción en partes esenciales del eje embrionario			
TRATAMIENTOS	**RT (%)**	**HT (%)**	**ET (%)**	**PT (%)**
1	35	10	10	0
2	25	15	0	0
3	70	30	20	20
4	95	75	60	65
5	100	90	70	80
6	90	90	85	70
7	60	15	5	0
8	65	15	5	15
9	85	55	45	25
10	75	10	20	15
11	75	30	30	30
12	70	45	30	35
T0	95	86,7	91,7	28
T1	98,3	68,3	68,3	63
T2	100	93,3	95	98

Fuente. Elaboración propia
RT = Radícula teñida (%)
HT = Hipocótilo teñido (%)
ET = Epicótilo teñido (%)
PT = Plúmula teñida (%)

El cuadro 8 demuestra de manera general y en términos de porcentaje la cantidad de radículas, hipocótilos, epicótilo y plúmulas teñidas dentro de cada tratamiento.

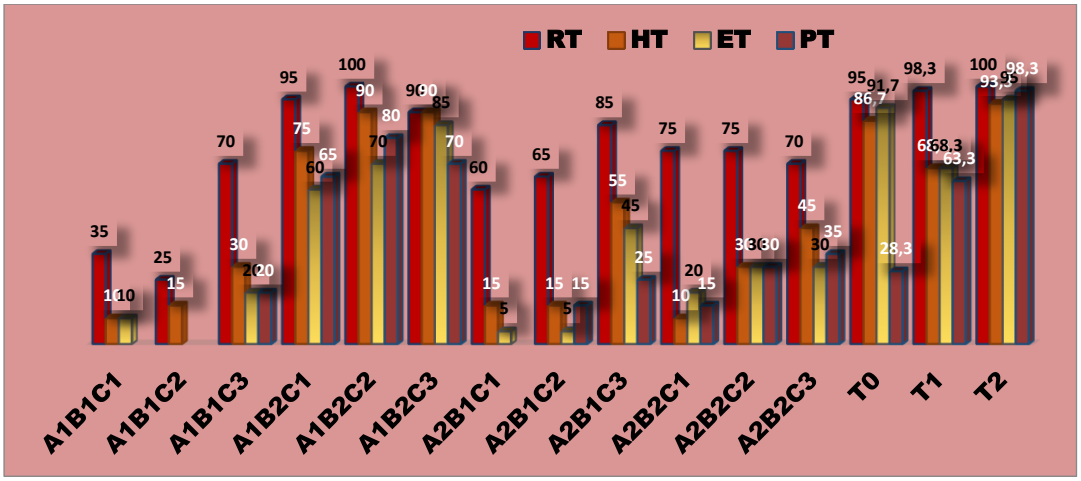


Figura 24. Coloración de partes esenciales del eje embrionario

La figura 24 nos muestra de manera más clara la cantidad en términos de porcentajes de las estructuras teñidas, en todos los tratamientos la estructura con más coloración fue la radícula (barra roja) debido a que se encuentra al extremo de la semilla expuesta de manera directa a la solución de TZ, como se puede observar en la figura la plúmula presentó menos tinción debido a la ubicación dentro de la semilla, el cual dependiendo de la concentración y tiempo de tinción llegó a teñir de manera variable dentro de cada tratamiento.

Delouche *et al.* (1971), en su ensayo topográfico al tetrazolio en algodón, demuestra 15 reacciones típicas de coloración, del 1 al 7 pertenecerían a las viables con el eje embrionario completamente teñidas, la última con una mínima parte de la radícula no teñida que vendría siendo la coleoriza de la raíz sin afectar a la radícula del eje embrionario. En el caso de la presente investigación se evaluó el eje embrionario de manera que, si una pequeña región no está teñida se incluye dentro de las semillas no viables, puede tener el 100% de radícula, hipocótilo y epicótilo teñido con regiones de la plúmula sin teñir, se estaría descartando la semilla como viable, esto ocurre con cualquier región del eje embrionario.

Por otro lado López y Gil (2017), clasifica sus resultados en 3 categorías; embriones viables y vigorosas, embriones viables con medio vigor y embriones no viables, en esta última se encontrarían semillas con eje embrionario, radícula y cotiledones sin teñir; embrión con lesiones o áreas muertas del eje embrionario y embriones con más del 50 % de tejido muerto. López y Gil (2017) afirma que, regiones o áreas muertas del eje embrionario estarían dentro de las semillas no viables. La tinción del 100 % de las estructuras mencionadas reflejan la viabilidad de las semillas, esto debido a que se evaluaron respecto al eje embrionario y no así con el embrión como tal.

4.3. Tejido vivo del eje embrionario (TVEE)

A continuación, y en base a las anteriores evaluaciones se puede reflejar de manera clara, general y resumida la significancia e interacciones en cada uno de los tratamientos y factores aplicados en el diseño experimental, incluyendo los tratamientos extra.

Cuadro 9. Análisis de varianza para la variable tejido vivo del eje embrionario (TVEE)

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor	
Modelo	389332,9	14	27809,49	35,21	<0,0001	**
TEST. vs FACT.	227069,25	3	75689,75	95,82	<0,0001	**
TEMP	23900,1	1	23900,1	30,26	<0,0001	**
CONCTR	63863,44	1	63863,44	80,85	<0,0001	**
TEMP*CONCTR	48592,6	1	48592,6	61,52	<0,0001	**
TIEMPO	21457,71	2	10728,85	13,58	<0,0001	**
TEMP*TIEMPO	1065,21	2	532,6	0,67	0,5101	NS
CONCTR*TIEMPO	3214,37	2	1607,19	2,03	0,1321	NS
TEMP*CONCTR*TIEMPO	170,21	2	85,1	0,11	0,8979	NS
Error	319911,82	405	789,91			
Total	709244,71	419				
CV %			47,83			

** P< 0,01= Altamente significativo
NS P> 0 05 = No significativo

El cuadro de análisis de varianza (cuadro 9) refleja diferencias altamente significativas (**) con $\alpha < 0,01$ para tratamientos, temperaturas, concentraciones, interacción temperatura por concentración y tiempo, por otro lado, para la interacción temperatura por tiempo, concentración por tiempo e interacción temperatura por concentración por tiempo, no se muestra diferencias significativas, sin embargo, al existir o no diferencias altamente significativas dentro y entre tratamientos el análisis no indica entre cual tratamientos específicamente hubo significancia. Con fines aclaratorios se muestra a continuación la prueba de rango múltiple Duncan, mostrando paso a paso el comportamiento de los tratamientos en comparación con el resto, así también las interacciones con los diferentes factores de variación.

Cabe mencionar que, si bien el coeficiente de variación (CV = 47,83) se encuentra fuera del rango aceptable para laboratorio, esto se debe a que los datos se encuentran muy dispersos con respecto a la media.

Cuadro 10. Prueba de rango múltiple Duncan para testigos vs factorial

Tratamientos	Promedio	Duncan (α = 5 %)
T2	96,75	A
T0	84,98	B
T1	71,67	C
Factorial	39,48	D

El cuadro 10 refleja los resultados de testigos vs los factoriales, se resumen en cuatro grupos diferenciados donde los testigos reflejaron mejores resultados, el grupo A que engloba al testigo T2 (0,5 de concentración de TZ, 30° de temperatura, 24 horas de tinción y semillas frescas con corte longitudinal) con 96,95 % de tejido vivo del eje embrionario dentro de las semillas tratadas, seguidamente se encuentra el testigo T0 (0,5 de concentración de TZ, 30° de temperatura, 24 horas de tinción, semillas almacenadas y corte longitudinal) representado con la letra B con 84,98 % de tejido vivo, con la letra C se encuentra el testigo T1 (0,5 de concentración de TZ, 30° de temperatura, 24 horas de tinción, almacenadas y doble corte en V) con 71,67 % de tejido vivo, finalmente con la letra D se encuentran los demás 12 tratamientos (25 y 35° de temperatura, 0,15 y 0,30 % de concentración de TZ y tiempos de tinción de 24, 48 y 72 horas) quienes con un promedio de 39,48 % de tejido vivo del eje embrionario se encuentran muy por debajo de los resultados obtenidos en los testigos.

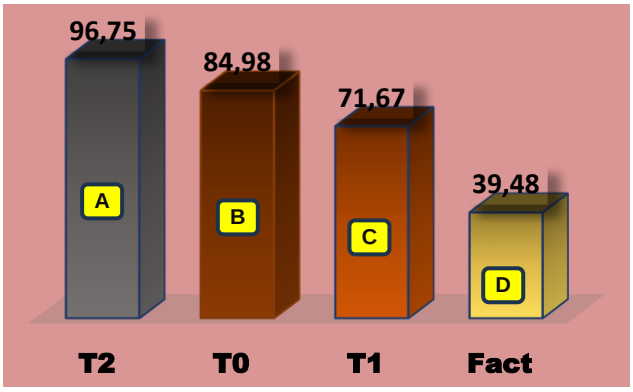


Figura 25. Prueba de rango múltiple Duncan para testigos vs factorial de la variable tejido vivo del eje embrionario (TVEE)

López y Gil (2017) consideran que las semillas frescas de “cacao” están cubiertas por una gran cantidad de mucílago, el cual puede afectar adversamente en la germinación. De igual manera las semillas de copoazú se encuentran fuertemente adheridas al mucílago a través del tegumento, por el cual se lo removió de la semilla y en los testigos se realizaron cortes.

Al respecto Pérez (2018), de igual manera diseccionó longitudinalmente la semilla previo análisis en semillas de algodón clasificando sus resultados en tres categorías.

El tema de corte previo se menciona debido a que fue la única diferencia de los tratamientos factoriales con 39,48 % de TVEE (tejido vivo del eje embrionario) quienes fueron sometidos sin realizar corte en la semilla. Con respecto a los testigos quienes presentaron entre 71,67 y 96,75 % de TVEE estos si se sometieron a cortes longitudinales, de esta manera hubo la reacción de la solución con los tejidos vivos de la semilla.

Cuadro 11. Prueba de rango múltiple Duncan para temperaturas

Temperaturas	Promedio	Duncan (α = 5 %)
T2	96,75	A
T0	84,98	B
T1	71,67	C
A	49,46	D
B	29,5	E

Como se puede observar en el cuadro 11, los resultados muestran 5 grupos claramente diferenciados donde los testigos T2 con la letra A reflejan mayor promedio con 96,75 % de tejido vivo, seguido del testigo T0 con la letra B con 84,98 %, como tercero se encuentra el testigo T1 con 71,67 %, por debajo de los testigos se encuentran los tratamientos que fueron sometidos a 25 °C, con la letra D y 49,43 % y finalmente con la letra E se encuentran los tratamientos cuya Tª fue de 35 °C con 29,5 % de tejido vivo.

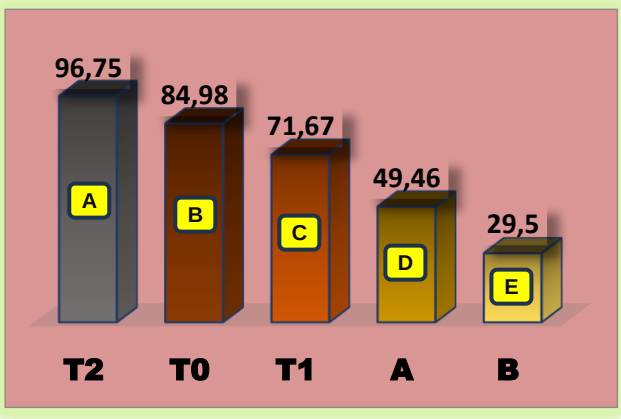


Figura 26. Prueba de rango múltiple Duncan para el factor temperatura de la variable tejido vivo del eje embrionario

La figura 26 refleja el resultado obtenido en la variable tejido vivo del eje embrionario con respecto a temperatura, las barras representadas por diferentes letras indican presencia de

diferencias en los tratamientos. Al respecto López *et al* (2018) no mencionan la temperatura con el cual trabajaron, sin embargo, Amaya y Motta (2007) utilizaron una T^a de 30 °C obteniendo una viabilidad de 95 ± 5 %, resultado similar de la presente investigación, tomando resultados del testigo T2 (semillas frescas).

Po otro lado, Delouche *et al.* (1971) recomiendan someter las semillas a una temperatura de 40 °C, por un tiempo de 1 a 2 horas, no obstante, en la presente investigación se tomó 35 y 25 °C como temperatura dentro de las factoriales y fuera de los testigos, los resultados bajo 25 °C fueron mayores que en temperatura de 35 °C quedando como últimos en el cuadro.

Cuadro 12. Prueba de rango múltiple Duncan para concentraciones

Concentración	Promedio	Duncan (α = 5 %)
T2	96,75	A
T0	84,98	B
T1	71,67	C
C2	55,79	D
C1	23,17	E

El cuadro 12 representa las medias Duncan para el factor concentración, estas medias se distribuyen en 5 grupos muy bien diferenciados, el grupo A representa al testigo T2 con 96,75 % de tejido vivo del eje embrionario, seguido del grupo B el testigo T0 con 84,98 %, el grupo C con 71,67 % de tejido vivo pertenece al testigo T1, los promedios representados con la letra D pertenecen a los tratamientos cuya concentración fue de 0,30 % de TZ con 55,79 % de TVEE (tejido vivo del eje embrionario), finalmente con la letra E se encuentran los tratamientos cuya concentración fue de 0,15 % con 23.17 % de tejido vivo.

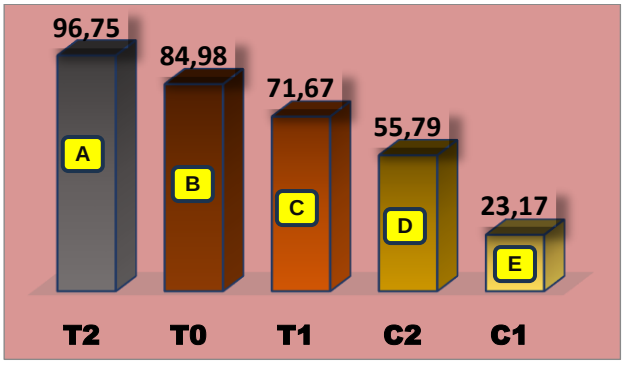


Figura 27. Prueba de rango múltiple Duncan para el factor concentración de la variable tejido vivo del eje embrionario.

La figura 27 nos muestra de manera gráfica las agrupaciones y promedios en cada uno de los tratamientos respecto a concentración dentro de los tejidos vivos del eje embrionario (TVEE). Amaya y Motta (2007), utilizaron una concentración de 0,50 % presentando resultados de 95,00 % de viabilidad, los testigos T0, T1 y T2 fueron sometidos bajo esas concentraciones de tal manera que muestran mejores resultados, el testigo T2 se compara con los obtenidos por el autor mencionado. Debemos recalcar que los testigos fueron sometidos a cortes en la semilla, lo que hace que tenga esos resultados tan favorables.

Sánchez *et al* (2003) utilizaron TZ al 1,00 % obteniendo un 92,00 % de viabilidad en semillas de copoazú, la presente investigación con el testigo T2 estaría superando este resultado, sin embargo, los demás testigos estarían por debajo, esto se debe a que las semillas no eran recién cosechadas, pero mediante el preparado de las semillas casi se alcanzaron a los resultados obtenidos por el autor mencionado. López y Gil (2017) por su lado utilizaron el TZ al 0,10 %, no obstante, los resultados no fueron claros clasificando las semillas solamente en 3 categorías, nuestros resultados con 0,30 % de TZ fueron claras al momento de evaluar, de haberse realizado cortes en la semilla estaría igualándose a los testigos, otro factor diferente respecto al T2 fue 3 días de guarda, al igual que la concentración C2 0,15 % de TZ con tinciones en su mayoría leve.

Cuadro 13. Prueba de rango múltiple Duncan para la interacción temperatura por concentración

Temperatura	Concentración	Promedio %	Duncan (α = 5 %)
T2	T2	96,75	A
T0	T0	84,98	B
A	C2	80	BC
T1	T1	71,67	C
B	C2	31,58	D
B	C1	27,42	DE
A	C1	18,92	E

A = 25°C
B = 35°C

La prueba de medias para la interacción temperatura por concentración se ven reflejadas en el cuadro 13, divididos en 7 grupos bien diferenciados. Encabezando el cuadro se encuentra el testigo T2 representado por la letra A con 96,75 %, seguido del testigo T0 con 84,98% representado por la letra B, curiosamente entre los mejores resultados se ubican los tratamientos cuyas temperaturas fueron 25 °C y una concentración de 0,30 % de TZ con la letra BC y un promedio de 80 % de tejido vivo, a continuación se encuentra el testigo T1

con 71,67 % en el grupo C quien se encuentra similar al grupo BC. De manera más grafica se puede observar en la figura 28.

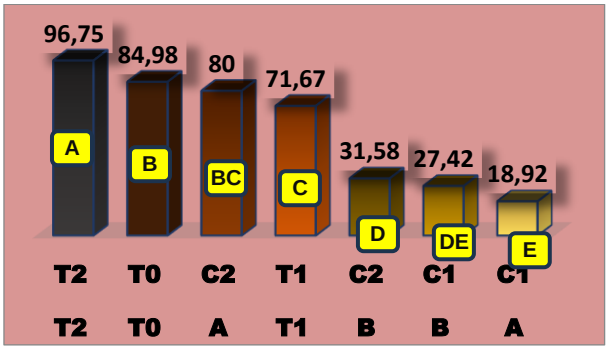


Figura 28. Prueba de rango múltiple Duncan para la interacción temperatura por concentración

Respecto a temperatura y concentración Delouche *et al.* (1971) recomiendan 40°C y concentración de 0,50 a 1,00 % de TZ, obteniendo mejores resultados. De igual manera Suarez *et al* (2012) mencionan que, concentraciones de 0.10 % y 0.25 % de TZ se logró coloración tenue mientras que con concentraciones de 0.50 %, 0.75 y 1.00 % alcanzó una tinción de todo el embrión a 40°C. Sin embargo, en la presente investigación se comprobó que una temperatura alta (35°C) no deriva en buenos resultados independientemente del tiempo de tinción, ubicándose en el último respecto a promedios de tejido vivo.

Una concentración de 0,50 % de TZ a una T ^{a} de 30 °C genera óptimos resultados como lo mencionan Amaya y Motta (2007), los testigos reflejaron de igual manera, no obstante, una temperatura de 25 °C y una concentración de 0,30 % es óptima y se pudo evidenciar en los resultados. Debemos siempre recalcar que, los testigos están dentro de los mejores resultados, debido especialmente al método de preparación de la semilla.

Cuadro 14. Prueba de rango múltiple Duncan para el factor tiempo

TIEMPO	Medias	Duncan (α = 5 %)
T2	96,75	A
T0	84,98	B
T1	71,67	C
Tie3	51,88	D
Tie2	37,62	E
Tie1	28,94	E

Tie1 = 24 h
Tie2 = 48 h
Tie3 = 72 h

En el cuadro 14 se compara el tiempo dentro de las factoriales con los testigos, en el cuadro se puede observar que las medias se dividen en 5 grupos; entre los primeros grupos A, B y C se encuentran los testigos T2, T0 y T1, con 96,75 %; 84,98 % y 71,67 % respectivamente. Seguidamente se encuentra el grupo D, tratamientos cuyos tiempos de tinción fueron 72 h (Tie3), debido a que la solución tuvo más tiempo de reaccionar en el tejido de la semilla. En el último grupo E se encuentra de manera general los tratamientos cuyo tiempo de tinción fue de 48 y 24 h, con 37,62 y 28,94 % respectivamente.

Es importante de igual manera mencionar que, el conjunto cotiledones y embrión están cubiertos por una membrana muy delgada y transparente que se denominó “integumento seminal” lo cual influyó de manera considerable en la imbibición y por ende en la reacción del TZ con la semilla. Esta también es la razón por la cual todos los testigos se encuentran por encima de las factoriales en términos de promedio. En la figura 29 se puede apreciar de mejor forma los resultados:

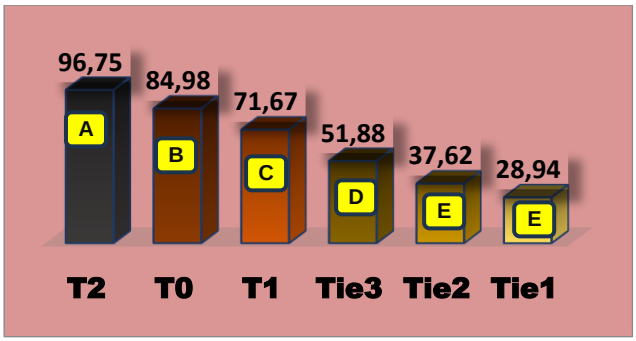


Figura 29. Prueba de rango múltiple Duncan para el factor tiempo

Sánchez *et al* (2003), realizaron la prueba bioquímica por un periodo de 1 hora, sin embargo, las concentraciones fueron: 0.50 %, 0.75 y 1.00 %, obteniendo óptimos resultados de hasta 74 % de viabilidad, comparado a nuestros resultados, nuestros testigos estarían incluso por encima de los mismos, los tratamientos con 72 horas de tinción (Tie3) no se quedaron atrás. Suarez *et al* (2012), por su lado, no mencionan el tiempo a los cuales fueron sometidos las semillas dentro de su ensayo.

Amaya y Motta (2007), utilizaron 24 horas obteniendo un 95 % de viabilidad en sus semillas, nuestros resultados no están alejadas de este promedio tomando como referencia el testigo T2 quien estaría en esos parámetros, los demás tratamientos si bien no presentan los mismos resultados se deben a factores ajenos al tiempo como ser: concentración, temperatura y método de preparación de la semilla.

4.4. Viabilidad

Independientemente del porcentaje de tinción individual de las estructuras, lo que determina la viabilidad de la semilla es el 100 % del eje embrionario con coloración. Si bien una semilla contiene radícula, hipocótilo y epicótilo teñido y no así la plúmula, la semilla no es viable, lo mismo ocurre con cualquier estructura no teñida.

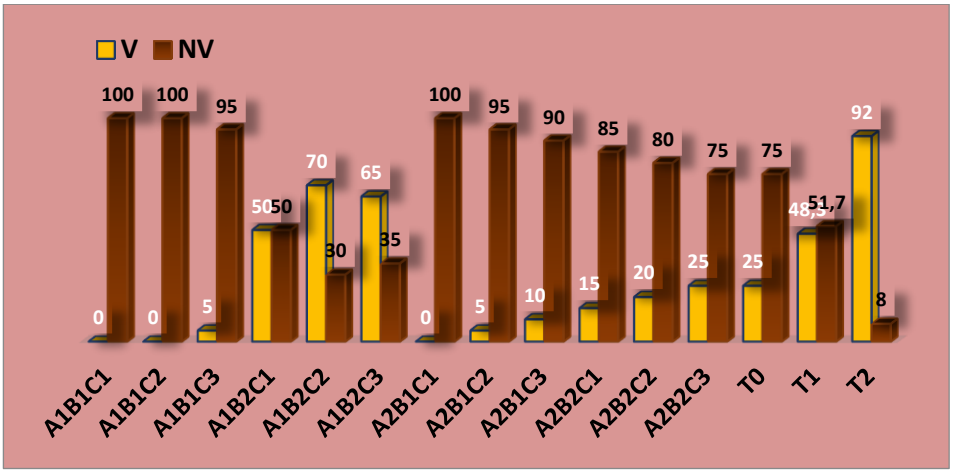


Figura 30. Distribución de frecuencias para la variable viabilidad

En la figura 30 se contabiliza solamente las semillas cuyo eje embrionario se encuentra con el 100 % de tejido con coloración (viable). Los tratamientos con bajo porcentaje de concentración de TZ, y 35 °C se puede observar que no tuvieron buenos resultados, reflejando viabilidad inferior al 25 % incluso con viabilidad nula. Por otro lado, los tratamientos bajo 25 °C, 0,30 % de TZ en sus tres diferentes tiempos de tinción tuvieron resultados, con viabilidad de 50 % (24 horas), 70 % (48 horas) y 65 % (72 horas), con viabilidad superior a la mitad de las semillas tratadas.

Respecto a los tratamientos extra, el T0 si bien tuvo un elevado porcentaje de tejido vivo hubo regiones sin coloración, por lo tanto, se considera semilla no viable elevando el número de semillas no viables, la barra del T1 nos muestra un 48,3 % de semillas viables, al igual que el anterior tratamiento hubo pequeñas regiones del eje embrionario sin teñir dado que se contabilizó como no viable. Por último, tenemos la barra del tratamiento T2, con 92 % de semillas viables, el mejor resultado de toda la investigación.

Amaya y Motta (2008), encontraron un 95 % ± 5 % de viabilidad en semillas de copoazú recién cosechados, similar a los resultados obtenidos en el presente trabajo con 92 % de viabilidad en el tratamiento T2 que fueron sometidos bajo las mismas condiciones, en

cuanto a los demás tratamientos se combinan diferentes concentraciones de TZ, tiempos e incluso temperaturas de tinción, esta información permitirá tomar decisiones en el momento de generar el protocolo de viabilidad en semillas de copoazú mediante el método bioquímico al tetrazolio o ensayo topográfico al tetrazolio.

Sin embargo, Sanchez *et al.* (2003) solo encontraron 34% de viabilidad en semillas de copoazú, con 1 % de TZ. Este resultado posiblemente se deba a la temperatura, condición de la semilla, método de preparación de la semilla y tiempo de tinción, datos que no se especifican el dicho documento. Estas condiciones son sumamente importantes al momento de realizar este tipo de ensayos, mejorando su eficiencia y llegando a una interpretación más precisa.

4.5. Tonalidades de patrones de tinción

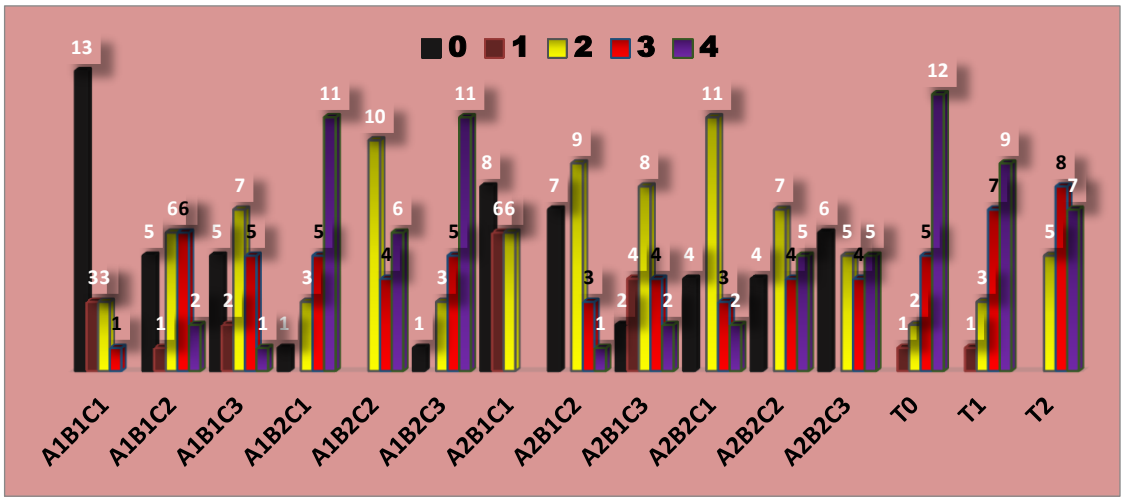


Figura 31. Distribución de frecuencias para la variable tonalidad de patrones de tinción

A1= 25 °C de temperatura
A1= 25 °C de temperatura
B1= 0,15 % concentración de tetrazolio
B2= 0,30 % concentración de tetrazolio
C1 = 24 horas de tinción
C2 = 48 horas de tinción
C3 = 72 horas de tinción
T0= 30 °C, 0,50 % de tetrazolio, 24 horas semillas con corte simple semilla almacenada
T1= 30 °C, 0,50 % de tetrazolio, 24 horas semillas con corte doble y semilla almacenada
T2= 30 °C, 0,30 % de tetrazolio, 24 horas semillas con corte simple semilla fresca

Según los resultados anteriores, en la figura 31 compararemos las tonalidades en los tratamientos. En los primeros tratamientos se puede observar mayormente entre tonalidades leves con barra amarilla (2), medias con barra roja (3) e intensas representadas por el número 4 barra morada, de igual manera los tratamientos extra muestran similares resultados con tonalidades entre leves, medias e intensas en términos de coloración, estos resultados reflejan que, concentraciones de 0,30 % y 0,50 % de TZ muestra similares

resultados de términos de tonalidades de tinción. Según Pérez (2018), las evaluaciones pueden ser confusas al momento de interpretarlas, al igual que concentraciones bajas de TZ puede no reflejar de manera clara la tinción en los tejidos esenciales de la semilla.

4.6. Categoría

Esta variable se evaluó con fines coadyuvar en la elaboración del mapa topográfico de viabilidad. Dentro de las semillas viables y no viables se encuentran diferentes tinciones las cuales dificultan la interpretación en el momento evaluarlas, de esta manera se hizo un análisis de distribución de frecuencias como se muestra a continuación:

Cuadro 15. Distribución de frecuencias para la variable categoría

CATEGORÍA		
Categoría	**Frecuencia**	**Porcentaje (%)**
VIABLE1	80	19
VIABLE2	14	3,3
VIABLE3	21	5
VIABLE4	34	8,1
NO VIABLE5	37	8,8
NO VIABLE6	14	3,3
NO VIABLE7	23	5,5
NO VIABLE8	79	18,8
NO VIABLE9	16	3,8
NO VIABLE10	6	1,2
NO VIABLE11	39	9,3
NO VIABLE12	57	13,6
Total	420	100

El cuadro 15 representa las 12 categorías que se establecieron mediante la evaluación, dentro de las semillas viables 80 semillas que representa al 19 % del total de semillas tratadas pertenecen a la categoría viable1, 14 semillas 3,30 % a la categoría viable2, 21 semillas 5 % a la categoría viable3 y finalmente con un total de 34 semillas 8,1 % corresponden a la categoría viable4. Dentro de las semillas no viables las que más se encontraron fueron la categoría no viable8 con un total de 79 semillas y 18,80 %, seguido de la categoría no viable 12 con 57 semillas y 13,60 % de total de semillas tratadas, a esta le sigue la categoría no viable5 con 37 semillas y 8,80 %, luego la categoría no viable7 con 23 semillas y 5,50 %, las demás categorías se encontraron en menor porcentaje y frecuencia.

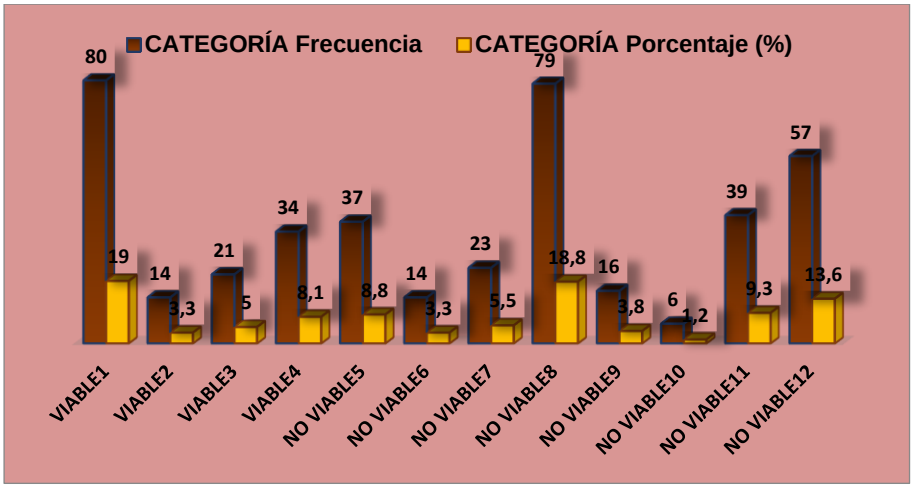


Figura 32. Representación en gráfico de la distribución de frecuencia pertenecientes a las diferentes categorías

De manera más clara se pueden observar la frecuencia o cantidad de semillas pertenecientes a las diferentes categorías en la figura 32. Al respecto Amaya y Motta (2007) no realizaron una categorización de sus resultados, sin embargo, Pérez (2018) al igual que López y Gil (2017), clasificaron sus resultados en tres categorías; viables y vigorosas, viables de medio vigor y no viables. Por otro lado, Delouche *et al.* (1971) clasificaron los resultados en 15 categorías las primeras 7 pertenecen a semillas germinables y el resto a semillas no germinables. Las categorías encontradas y diferenciadas dentro de la presente investigación estarían similares a la mencionada por Delouche *et al* (1971), de esta manera se facilita la interpretación al momento de evaluar los resultados.

4.7. Método de preparación de las semillas

4.7.1. Porcentaje de humedad

Uno de los parámetros de evaluación en semillas es el contenido de humedad, razón por el cual se evaluó esta variable. Se realizó tres pesos de humedad de cinco semillas cada una y los resultados se reflejan en el cuadro 19:

Cuadro 16. Porcentaje de humedad en semillas de *Theobroma grandiflorum*

Peso Inicial	Peso Final	Humedad %
16,62	8,96	46,10
18,45	9,22	49,99
17,67	8,23	53,40
Promedio		**49,83 %**

El promedio del porcentaje de humedad refleja 49,83 %, casi la mitad de todo el peso, para Amaya y Motta (2008), el promedio de humedad fue de 68 ±3 % en semillas de copoazú. Por otro lado, Davila (2008), en su trabajo realizado en el cacao (*Theobroma cacao*) el contenido de humedad de la semilla fresca, sin sometimiento a la temperatura de desecación es de 43,10%, esta investigación se realizó con el objetivo de conservar mayor tiempo las semillas de cacao. Para el presente trabajo no era necesario desecar las semillas ya que se trata de viabilidad y comparación con germinación, no obstante, es necesario tener conocimiento del porcentaje de humedad con el que se trabajó. El promedio de humedad en la presente investigación es inferior al encontrado por Amaya, sin embargo, se pudo obtener buenos resultados.

4.7.2. Preparación de las semillas

Según la estructura, clasificación, entre otras características, cada semilla cuenta con diferente método de preparación previo a ensayos mediante el método bioquímico al tetrazolio, razón por el cual los tratamientos extra contaron con diferente método de preparación respecto a los demás tratamientos.

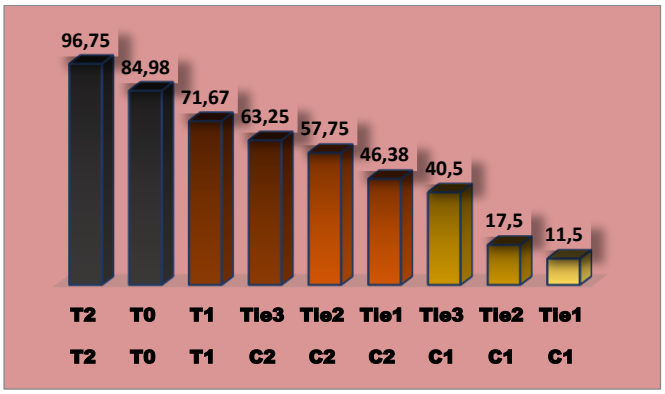


Figura 33. Tejido con coloración (vivo) del eje embrionario

La figura 33 revela el porcentaje de regiones teñidas por el tetrazolio, aunque difiere mucho del porcentaje de viabilidad, los tratamientos extra reflejan mayores porcentajes de tinción en regiones del eje embrionario, con 96.75, 84.98 y 71.67 %, se debe aclarar que estos tratamientos fueron sometidos a cortes longitudinales sin dañar el embrión, el tratamiento T1 con doble corte. Por otro lado, los demás tratamientos necesitaron un mayor tiempo de tinción y concentración debido a que fueron tratadas sin previo corte, de acuerdo a ello se fueron reflejando los resultados, en forma descendente de 63,25 hasta llegar a 11,50 %.

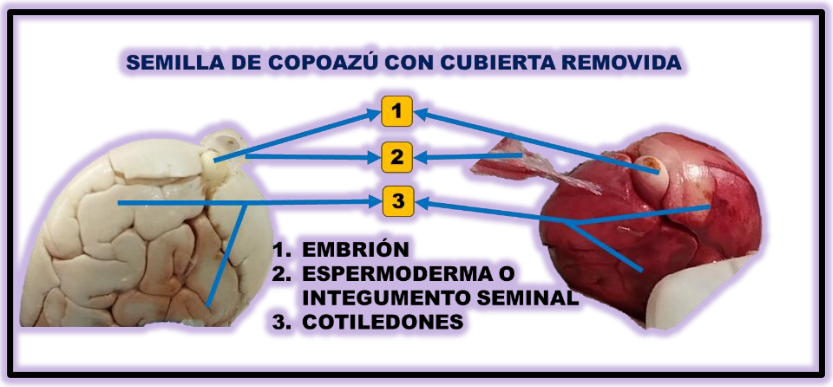


Figura 34. Semilla de copoazú con y sin tinción con tegumento removido e integumento visible

En la figura 34 se puede observar de más cerca la membrana transparente y delgada que cubre los cotiledones y el embrión “integumento seminal”, por el cual fue dificultoso el accionar del TZ. Al respecto Valdivia *et al.* (2018), mencionan que las semillas de espárrago necesitan de un pre tratamiento de 48 horas en agua para la acción de tetrazolio. En la presente investigación no es necesario un previo remojo debido a que las semillas de copoazú son de tipo recalcitrante tropical, poseen un elevado porcentaje de humedad, suficientes para reaccionar con el tetrazolio.

Por otro lado, Adam (2007), menciona que el tiempo requerido para una tinción aceptable depende del tipo, sanidad y vigor de semilla además de método de preparación, concentración de solución y especialmente temperatura, también recomienda en próximos trabajos realizar diferentes cortes, de manera que pueda exponerse al embrión y mejorar la absorción del tetrazolio.

Así también Delouche *et al.* (1971), indican dos métodos de preparación de la semilla que son: bisección y punción o separación del extremo en caso de semillas pequeñas. Los mismos afirman que en algunas semillas es necesario remover la cubierta y también otras membranas para permitir la absorción del tetrazolio. López y Gil (2017), realizaron este ensayo en su similar especie (cacao) en el cual no se removió la cubierta, el autor clasifica las semillas en 3 categorías; viables de alto vigor, viables de bajo vigor y no viables, sin embargo, las dos últimas genera una inquietud debido a que, la categoría viable presenta una región del embrión de color café y otra región sin teñir, mientras que la categoría no viable presenta coloración en gran parte, solo que con menor intensidad.

Bajo estas referencias y tomando en cuenta que las semillas de copoazú poseen una membrana al igual que en la semilla de café denominada capa de pectina o integumento

seminal, se vio pertinente acuñarle el mismo denominativo “integumento seminal” a la membrana que cubre al conjunto cotiledones y embrión (figura 34), dicha membrana impide el rápido accionar del tetrazolio sobre el tejido de la semilla. Debido a estos aspectos se afirma que, por este motivo los tratamientos cuyas semillas no fueron sometidos a cortes, mostraron menores porcentajes de coloración y requirieron mayor tiempo de tinción.

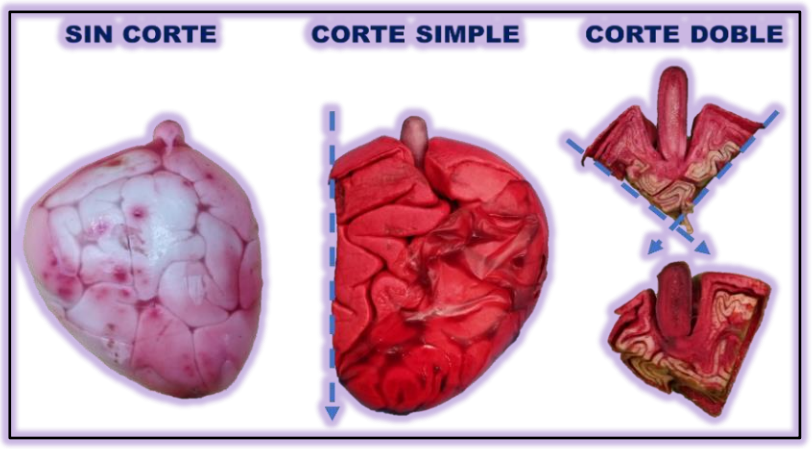


Figura 35. Reacción del tejido del embrión al tetrazolio

La Figura 35 refleja el grado de tinción y como se mencionó en la anterior figura la semilla posee una cubierta que se la denominó “integumento seminal”, ésta en forma considerable impide la imbibición del TZ, como se puede apreciar en la figura, la semilla sin corte tiene pocas regiones con coloración, la semilla con corte simple longitudinal pudo reaccionar eficientemente ante el TZ, finalmente la semilla con doble corte en forma de V también tuvo buena reacción al TZ y como se puede observar en la imagen también refleja la viabilidad de la semilla sin alterar la interpretación, por ejemplo, la semilla de la parte superior con doble corte indica no ser viable ya que el eje embrionario se encuentra sin coloración, contrario a la semilla que se encuentra debajo (viable) embrión 100% con coloración.

4.8. Porcentaje de germinación

La germinación se realizó con fines de coadyuvar con los resultados en la generación de una norma técnica de semillas de copoazú. Dentro de la investigación se trabajó igual con tres temperaturas; 25, 30 y 35 °C (30 °C para tratamientos extra). En la figura 36 de germinación se puede observar en porcentajes la germinación de las semillas de copoazú bajo las 3 temperaturas incluyendo a los tratamientos extra (testigos).

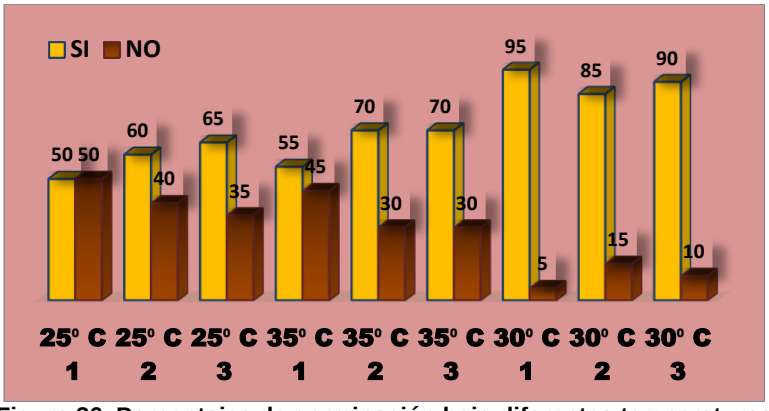


Figura 36. Porcentajes de germinación bajo diferentes temperaturas

En los resultados de viabilidad en términos de temperatura se pudo observar que, entre 25 y 30 °C se obtuvo mejores resultados, no obstante, en germinación se tuvo mayor número de semillas germinadas bajo 30 y 35 °C independientemente del estado de la semilla. Comparando entre 25 y 35 °C en términos de promedio se obtuvo 58 y 65 % respectivamente, en los tratamientos extra se obtuvo 90 % de germinación bajo 30 °C, en este caso considerando que las semillas eran frescas. El límite superior para germinación oscila entre 35 y 40 °C (Kossmann *et al.*, 2012), lo que confirma que para germinación en semillas la temperatura óptima sería a los 35 °C como máximo.

En su trabajo Kossmann *et al.* (2012), a una temperatura de 30°C obtuvieron en promedio 91,50 % de germinación y a una temperatura de 25 °C 66,50 % de semillas germinadas (plántulas normales). Estos resultados se asemejan a la presente investigación, la reducción de semillas germinadas se debe a las condiciones de temperatura a las cuales fueron sometidas, menores temperaturas conllevan a menor porcentaje de germinación. Sanchez *et al.* (2003), por otro lado, encontraron resultados en germinación de; 19 % en invernadero y 83 % *in situ* a los 19 días, lo que nos lleva a afirmar que los resultados obtenidos estarían dentro de ese rango resaltando el tratamiento extra T2 con 90 % de germinación.

Figura 37. Proceso de germinación de la semilla de copoazú

La germinación de la semilla como se puede observar en la figura 37, pasados 4 días de la siembra empieza a emerger la radícula y el hipocótilo de la semilla, llegando a los 8 días se puede observar un hipocótilo más elongado, se pude también apreciar las raíces secundarias, 13 días posterior a su siembra ya se observa una raíz bien desarrollada con epicótilo visible, a los 21 días ya cuenta con un epicótilo casi erecto de aproximadamente 3 cm de altura con las primeras hojas opuestas, a los 25 días entre 5 y 7 cm con las primeras hojas con más desarrollo, a los 29 días sobrepasa los 15 cm de altura.

Según, Kossmann *et al.* (2012) en la germinación de semillas de copoazú se considera 21 días para la primera evaluación o conteo y 35 días para el conteo final considerando sean plántulas normales. Considerando estos resultados se puede confirmar la primera evaluación a los 21 días, aunque para el conteo final 35 días se considera mucho tiempo tomando en cuenta que a los 29 días sobrepasa los 15 cm de altura. Si bien el vigor de las semillas son muy diferentes se estima una evaluación final a los 26 +/- 1 días posterior a su siembra.

4.9. Comparación viabilidad / germinación

Para poder argumentar en la generación de una norma técnica para la evaluación de semillas de copoazú, es necesario realizar comparaciones de los resultados de viabilidad mediante el ensayo topográfico al tetrazolio con los resultados de germinación convencional. A continuación, se muestra un cuadro en el cual se reflejan las diferencias en porcentajes de viabilidad respecto a germinación.

Cuadro 17. Comparación de viabilidad y germinación de semillas de copoazú

Semillas	Temperatura	Viabilidad	Temperatura	Germinación	Diferencia
3 días	25°C	61,67%	25°C - 35°C	54,70%	**6,96%**
Recién cosechadas	30°C	92%	30°C	88,33%	**3,67%**

3 días = Las semillas fueron utilizadas pasados 3 días posterior a su cosecha

El cuadro 17 nos muestra un resumen de resultados del porcentaje de viabilidad de las semillas, para ello se tomó los mejores resultados que se presentaron a los 25 °C y para germinación se promedió los resultados de ambas temperaturas 25 y 35 °C. En el caso de semillas recién cosechadas que pertenecieron al tratamiento T2, se tomó los resultados para realizar la comparación, dando un 92 % de viabilidad a 30 °C y un 88,33 % de germinación.

4.9.1. Comparación porcentaje de viabilidad y porcentaje de germinación

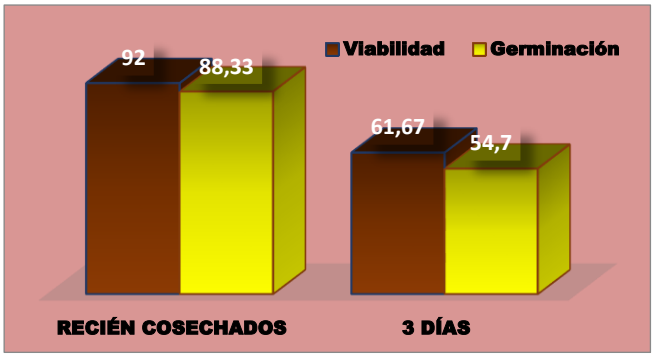


Figura 38. Comparación del % de viabilidad y % de germinación

Las barras de la figura 38 nos muestra de manera clara la disminución en términos de porcentaje de germinación respecto a viabilidad, esta diferencia en semillas recién cosechadas es de 3,70 % y en semillas empleadas 3 días posterior a su cosecha, la diferencia fue de 6,90 %

Calla (2016), realizó el mismo ensayo en semillas de café, obteniendo un 99 % de viabilidad, 86% de germinación y una diferencia de 13 % lo cual concluye que, de cada 100% de semilla analizada 99 % serán viables, 86 % germinarán y un 13 % podrán ser semillas anormales, duras o muertas. En el caso nuestro, en semillas analizadas en el laboratorio a los 3 días después de su cosecha del 100 % de semillas analizadas 61,67 % serian viables, 54,7 % llegarían a germinar y un 6,90 % no germinaría por diferentes factores. En semillas

recién cosechadas un 92 % serian viables, 88,33 % llegarían a formar una planta normal y existiría un 3,7 % de semillas que no llegarían a germinar.

Cuando se evaluó las causas de deterioro de las semillas de copoazú se determinó que la mayor causa fue la baja temperatura, las semillas recalcitrantes no toleran cambios en este factor. El material biológico se obtuvo del departamento de Cochabamba (trópico) vía terrestre hasta llegar a La Paz. Las semillas hasta el tercer día permanecieron en la mazorca por lo que el porcentaje de humedad se mantuvo relativamente.

4.10. Pérdida de viabilidad de semillas

Para determinar las causas de deterioro y perdida de viabilidad de la semilla de copoazú se tomaron los resultados del testigo T2 (semillas frescas), tratamientos con más porcentaje de viabilidad sometidas a los 3 días y finalmente se hizo una prueba pasados los 3 días posterior a su cosecha.

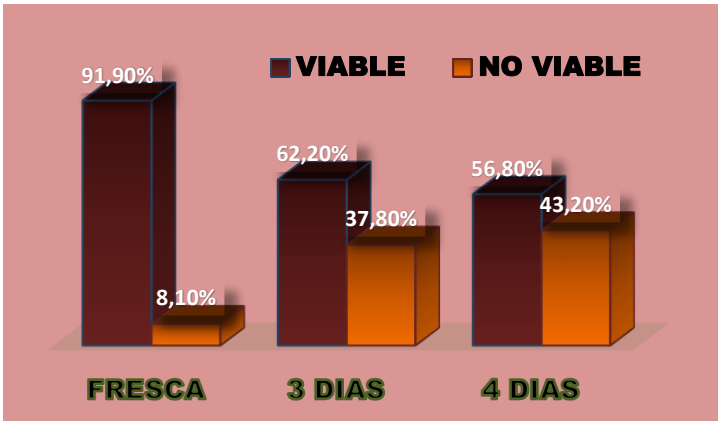


Figura 39. Pérdida de viabilidad de la semilla de copoazú

En la figura 39 se puede observar la comparación de semilla fresca con semillas sometidas a los tres y cuatro días posterior a su cosecha, la semilla fresca refleja un 92 % de semillas viables y a medida que van pasando los días las semillas pese a encontrarse dentro del fruto manteniendo en cierta forma la humedad, no toleran temperaturas bajas. Las semillas que fueron sembradas a los tres días perdieron aproximadamente 30 % de viabilidad y alrededor de 36 % a los cuatro días, lo que se pudo observar en el proceso de la investigación es que, el porcentaje de humedad dentro la semilla no varía mucho en las tres observaciones.

Según Hong *et al* (1996) citado por Amaya y Motta (2008) y Jaimes *et al.* (2014), las semillas de tipo recalcitrante son sensibles a temperaturas bajas, estos resultados corroboran nuestros resultados, la principal causa de la pérdida de viabilidad en semillas de copoazú es por su recalcitrancia, al no tolerar bajas temperaturas.

Figura 40. Comparación de una semilla totalmente muerta con una semilla viable

El resultado de las semillas totalmente muertas y semillas frescas se refleja en la figura 40, se puede observar que la semilla totalmente muerta no muestra señales de coloración debido a que no hubo actividad por parte de la solución de TZ y la otra se puede observar que sí hubo reacción por parte del TZ. Estos resultados demuestran lo que los autores mencionados y los resultados de este trabajo sobre la perdida de viabilidad por el tipo de semilla recalcitrante tropical.

4.11. Mapa topográfico de viabilidad de la semilla

Para determinar el mapa de viabilidad mediante los patrones topográficos de tinción al tetrazolio se observó cada una de las semillas a detalle y con la ayuda de un estereoscopio, quedando como resumen 12 patrones de tinción que más se repetían dentro de los diferentes tratamientos que dieron origen al siguiente mapa topográfico:

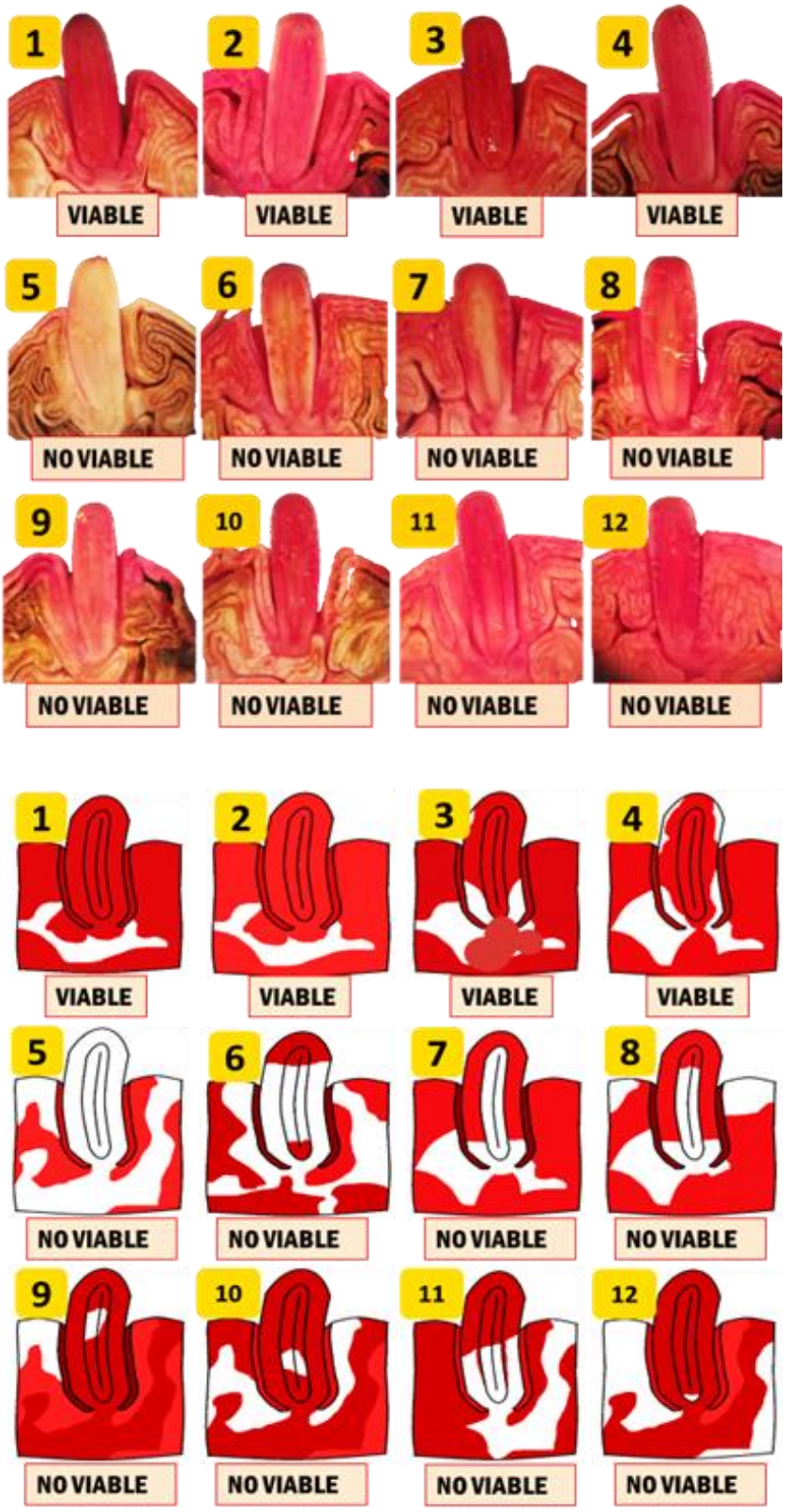


Figura 41. Mapa topográfico de semillas de copoazú mediante los patrones topográficos de tinción al TZ, áreas con coloración representan a los tejidos vivos, áreas blancas representan a tejidos muertos, los criterios se evaluaron con respecto al eje embrionario

En la figura 41 la parte superior de la imagen se encuentran los patrones de tinción más repetitivos y en la parte inferior de la imagen se encuentran los mismos patrones con fines aclaratorios de zonas de tinción en las diferentes regiones del embrión, de manera más clara se encuentra la imagen en el anexo 1.

Según López y Gil (2017), las semillas cuyo embrión es rojo carmín son las de alto vigor, por lo tanto, las semillas pertenecientes a la categoría 1, pertenecerían a semillas viables y de alto vigor, la categoría 2 a semillas viables y de bajo vigor, según la baja intensidad de la coloración las categorías 3 y 4 de la presente investigación pertenecen también a semillas viables de alto vigor debido al color rojo carmín.

Delouche *et al.* (1971), en su ensayo en semillas de algodón (*Gossypium spp*.) clasifican los resultados en 15 categorías, dentro de las viables se encuentran semillas cuyos tejidos demuestran el 100 % de coloración no muy intensas, semillas con pequeñas regiones de los cotiledones sin teñir y semillas con pequeñas regiones de la radícula sin teñir, pero sin afectar a regiones del eje embrionario.

Por otro lado, Perez (2018) cuyo ensayo también realizó en algodón, divide los resultados en tres clases; embriones viables y vigorosos, embriones viables con medio vigor y embriones no viables, esta última hace referencia a embriones con eje embrionario, radícula y cotiledones sin teñir embrión con lesiones a áreas muertas del eje embrionario y embriones con áreas de las del 50 % de tejido muerto. Estos resultados argumentan las categorías del 5 al 12 de la presente investigación, quienes representan a semillas no viables, presentando regiones del eje embrionario aproximadamente del 5 al 100 % sin coloración (tejido muerto).

Con las aclaraciones anteriores se especifican las 12 categorías del mapa topográfico al tetrazolio en semillas de copoazú.

1 = **VIABLE**. Toda la región del embrión se encuentra completamente teñido color rojo carmín.

2 = **VIABLE**. El embrión colorea uniforme, de un color rojo-rosa menos intensa que la anterior.

3 =**VIABLE**. La parte media inferior del embrión no colorea, sin embargo, el eje embrionario se encuentra completamente coloreado de color rojo carmín

4 = **VIABLE**. Los bordes del embrión no se encuentran coloreadas, sin embargo, el eje embrionario se encuentra completamente coloreado de rojo carmín.

5 = **NO VIABLE**. Embrión sin colorear (tejido del embrión completamente muerto).

6 = **NO VIABLE**. Extremo superior del embrión (radícula) y plúmula coloreados, resto del eje embrionario sin colorear (hipocótilo).

7 = **NO VIABLE**. Más de la mitad del embrión coloreado a excepción de todo el eje embrionario.

8 = **NO VIABLE**. Más de la mitad del embrión coloreado a excepción con parte de la radícula, resto del eje embrionario sin teñir

9 = **NO VIABLE**. Región anterior a la radícula sin teñir, parte esencial del eje embrionario

10 = **NO VIABLE**. Región anterior a la plúmula sin teñir, parte esencial del eje embrionario

11 = **NO VIABLE**. 50 % del embrión sin coloración incluidos el eje embrionario.

12 = **NO VIABLE**. Punta extrema del eje embrionario sin teñir (plúmula).

4.12. Protocolo de viabilidad mediante el ensayo topográfico al tetrazolio

A continuación podemos apreciar en un resúmen representado en un protocolo cuya información se extrajo de los mejores resultados, en el cual se muestra los pasos a seguir para llevar a cabo un ensayo de viabilidad mediante el test al tetrazolio en semillas de copoazú.

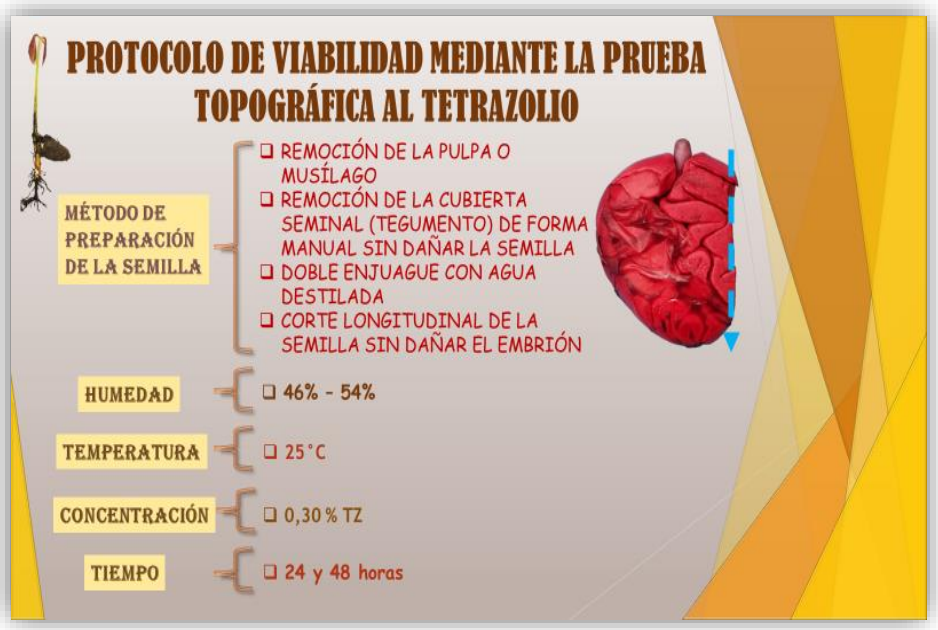


Figura 42. Protocolo de viabilidad mediante la prueba topográfica al tetrazolio, en laboratorio del departamento de La Paz

El protocolo de viabilidad de la figura 42 se realizó en base a los resultados obtenidos en laboratorio con semillas empleadas 3 días posterior a la cosecha. En este protocolo se resume las condiciones en las que se debe adecuar la semilla, temperatura de la cámara de germinación, acondicionamiento de la semilla, contenido de humedad de la semilla, concentración de tetrazolio y tiempo de tinción en términos de horas. Es importante el acondicionamiento de la semilla sobre todo el corte de la semilla para que los resultados sean interpretados sin ningún problema, como se evidenció en los resultados, el accionar de la sal de tetrazolio con el tejido vivo de la semilla es mas efectiva con dichos cortes.

Debemos mencionar que este protocolo es para realizar en condiciones de laboratorio del departamento de La Paz, algunas semillas son llevadas al laboratorio pese a ser recalcitrante tropical, sin embargo, se la realiza y ahora contando con un protocolo se lo hará de inmediato.

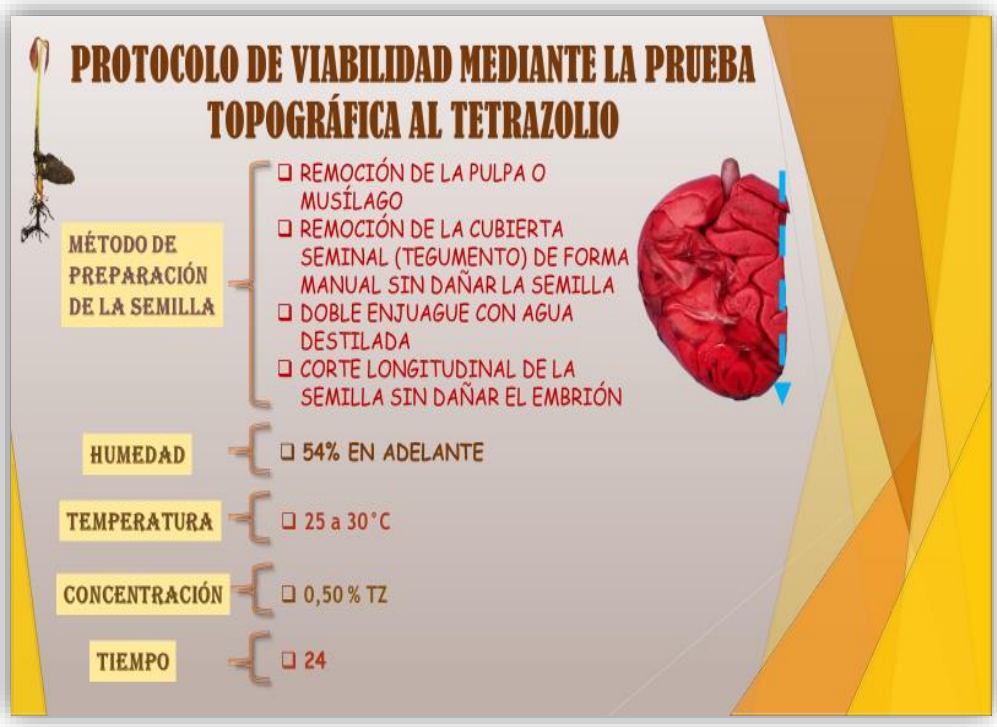


Figura 43. Protocolo de viabilidad mediante la prueba topográfica al tetrazolio en lugar de cosecha (producción)

La figura 43 representa en resumen las indicaciones de condiciones de la semilla, humedad, temperatura, concentración de tetrazolio y tiempo de tinción, a diferencia del anterior protocolo esta representa a semillas frescas (semillas recién cosechadas) el análisis se realizó en el lugar de producción. Las temperaturas del trópico de Cochabamba oscilaban entre los 25 a 35 °C, se las realizó a esa temperatura, el porcentaje o contenido de humedad en la semilla debería ser superior a 54 % debido a que pasados tres días contaría con esa y un mínimo de 46 % de humedad.

Este protocolo es de mayor importancia, de manera que es un procedimiento que el técnico lo puede realizar en campo, en el lugar de producción y contando con el mapa topográfico podría realizar la evaluación de manera más rápida, efectiva incluso se podría emitir un resultado en el menor tiempo posible, ya que en laboratorio vía terrestre se demora 1 a 2 días en el mejor de los casos solo en adquirir la semilla debiendo realizarse el ensayo de manera inmediata.

5. CONCLUSIONES

Según los objetivos planteados y los resultados obtenidos en el presente estudio, nos permite sustentar las siguientes conclusiones:

- Se establecieron las diferentes temperaturas, concentraciones de tetrazolio y tiempos de tinción encontrando como óptimos los siguientes: las temperaturas óptimas para el ensayo son de 30 °C y 25 °C, en cuanto a concentraciones los mejores resultados se presentaron con concentraciones de 0,50 % y 0,30 % de TZ, finalmente en términos de tiempos, dependiendo el método de preparación de la semilla, temperatura y concentración fueron factores muy influyentes en los resultados, sin embargo, el análisis reflejó 24 horas para concentración 0,50 %; 72, 48 y 24 horas para concentración de 0,30 % mostrando mayor porcentaje de actividad en mayor tiempo

- El método de preparación de la semilla se resume en; despulpado de la semilla eliminando la mayor cantidad de mucilago posible, remoción del tegumento o cubierta seminal, doble enjuague en agua destilada, corte longitudinal a un costado de la semilla sin dañar el embrión, finalmente la introducción de las semillas en la solución de tetrazolio.

- La causa de deterioro en semillas de copoazú prácticamente fue por la recalcitrancia, la semilla dentro de la mazorca relativamente conserva su humedad, sin embargo, la baja temperatura ocasiona la pérdida de viabilidad.

- Se elaboró un mapa topográfico de viabilidad de semillas de copoazú, resumiendo en 12 categorías, con patrones de tinción que más se repetían dentro del ensayo. Las categorías del 1 al 4 corresponden a semillas viables y categorías del 5 al 12 representan a semillas no viables.

- Se elaboraron dos protocolos de viabilidad por el método bioquímico al tetrazolio, este resultado resume las condiciones en las que se debe realizar el ensayo. Este protocolo se realizó tanto para laboratorio, tomando en cuenta las condiciones y la demora en la adquisición del material genético como para campo, en este sentido será de mayor aporte en el análisis de certificación y fiscalización de semillas de copoazú (*Theobroma grandiflorum*). que pasará a ser parte de una futura norma general o especifica en este cultivo.

6. RECOMENDACIONES

En base a los objetivos, resultados y conclusiones del presente trabajo, se pueden formular las siguientes recomendaciones:

- En primer lugar, se recomienda siempre realizar el tratamiento previo, con remoción de la pulpa o mucilago, remoción de la cubierta seminal manual sin dañar la semilla, realizar un doble enjuague con agua destilada, finalmente realizar el corte longitudinal sin dañar el embrión. Utilizar una concentración de 0,30 %, temperatura de 25 °C por un lapso de 24 horas, de preferencia que no baje de 46 % de humedad ya que fue la mínima que se registró

- Para una evaluación en campo se recomienda de igual manera el mismo tratamiento previo de la semilla, en este caso la concentración que se recomienda es de 0,50 % de TZ, a una temperatura ambiente del lugar de producción que generalmente oscila entre 25 a 30 °C, por un lapso de 24 horas incluso podría ser menor el tiempo. En el caso de semillas frescas la humedad no debería ser menor a 54 % debido a que presentan mayor humedad de una que se lleva a laboratorio.

- Se recomienda probar concentraciones inferiores a 0,50 % de TZ con semillas previamente tratadas como se mostró en los resultados, esto con fines de comprobar la eficacia de la solución con los tejidos del embrión de la semilla, bajo diferentes condiciones a las estudiadas.

- También se recomienda realizar diferentes pruebas de humedad en las semillas, de manera que se pueda determinar cuántos días puede durar la semilla dentro y fuera de la mazorca, realizando controles de cantidad de humedad perdida por cada día, almacenado.

- Así también se recomienda realizar pruebas de temperaturas, para determinar la temperatura en la cual se pueda almacenar la semilla el mayor tiempo posible, o en su defecto determinar temperaturas máximas y mínimas en las cuales se puede mantener por mayor tiempo.

- Se recomienda también realizar estudios de costos del análisis mediante este método, de manera que esté disponible ante la necesidad del productor con fines de realizar análisis de calidad del material genético con la que cuentan.

- Este trabajo está disponible a ajustes, por lo tanto, se recomienda optimizar el protocolo de acuerdo a diferentes condiciones diferentes que se pueden presentar, temperaturas diferentes, mejor acceso del material genético, entre otras.

7. BIBLIOGRAFÍA

Adam, G., 2007. Germinación, vigor, viabilidad, calidad y mejora de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.). Faculte Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid.

Aleman, F., Laime, N., 2013. Procedencia y efecto de sombra en la viabilidad de la semilla de copoazú en el municipio de Villa Tunari. Rrevista de la Agricultura, 7.

Amaya, S., Motta, D., 2008. Clasificación de la semilla de copoazú Theobroma grandiflorum (willd. Ex spreng.) K. Schum según su viabilidad en Florencia Caquetá. Universidad de la Amazonía, 5.

Bedoya, C., Mejia, M., 2003. Investigación en reproducción sexual y asexual de las especies promisorias: araza, *Eugenia stipitata* Mac Vaugh; copoazú, *Theobroma grandiflorum* Wild ex Spreng (Shum) y camu camu *Myrciaria dubia*, (H.B.K.) MacVaugh de la Amazonia Colombiana. Colombia. 48 p.

Benito, L., Herrero, N., Jimenez, I., Pañuelas, J., 2004. Aplicación de métodos colorímetros para la determinación de la viabilidad en semillas de Pinus pinea: test de tetrazolio e índigo carmín. Sociedad Española de Ciencias Forestales, 6.

Bewley, J., Black, M., 1994. Seeds: physiology of development and germination. New York Plenum Press. 445 p.

Calla, C., 2016. Determinación de la concentracion de tetrazolio y tiempo de tinción adecuado para el análisis de viabilidad en semillas de café. Tesis Lic. Bolivia. UMSA.

Camacho, M., Tatis, H., Ayala, C., 2017. Características morfométricas, anatómicas y viabilidad de semillas de *Cedrela odorata* L. y *Cariniana pyriformis* Miers. Scielo. Colombia. 13 p.

Courtis, A., 2013. Germinación de semillas . Cátedra de Fisiología Vegetal. 22 p.

Chuncho, E., Chuncho, C., Aguirre, Z., 2019. Anatomía y morfología vegetal. Ecuador. Universidad Nacional de Loja.

Davila, D., 2008. Prolongacion de la viabilidad de la semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.), bajo cuatro sistemas de conservación en Tingo María'. Perú. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional Agraria de La Selva. 80 p.

Delouche, J., Still, W., Raspet, M., Lienhard, M., 1971. Prueba de viabilidad de la semilla con tetrazol. In: AIRES, (Ed.). Departamento de Agronomía, Mississippi. 71 p.

Dias, MC., Silva, WR., 1998. Teste de tetrazolio em sementes de café. Brasil. Instituto Agronomico do Paraná - Londrina. 13 p.

Espindola, Y., Romero, L., Ruiz, R., Luna, C., 2018. Influencia de las condiciones de incubación sobre la germinación de semillas de diferentes individuos de *Pterogyne nitens*. Quebracho, Argentina.13 p.

GRLL, (Gobierno Regional La Libertad). s. f. Boletín técnico La Semilla. La Libertad Portal Agrario Regional. 6 p.

Guebara, J., Cardozo, C., Santos, L., 2020. Caracterización morfo-anatómica y protocolo para estimar la viabilidad de semillas de *Psidium guajava*. Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 7 p.

Hoekstra, F., Haigh, A., Tettero, F., Van Roekel, T., 1994. Changes in soluble sugars in relation to desiccation tolerance in cauliflower seeds. Seed Sci. 143-147 p.

IBCE, (Instututo Boliviano de Comercio Exterior). 2010. Perfil de Mercado Copoazú y Achachairú IBCE Bolivia. 18 p.

INIAF, 2014. Normas específicas de certificación de semillas Bolivia, p. 164.

INIAF, 2020. Informe anual de resultados 2019. Dirección Nacional de Semillas - INIAF, Santa Cruz - Bolivia

ISTA, (International Seed Testing Association). 2003. Evaluación de plántulas. ISBN 1629065056

ISTA, (International Seed Testing Association). 2007. International Rules for Seed Testing Switz. ISBN 1629065237

Jaimes, C., Garcia, G., Carballo, A., Calderon, G., Jamines, F., Cuevas, J., 2014. Tolerancia a la desecación en semillas de nanche (*Byrsonima crassifolia* L.) Kunth. Scielo. 5 (5). 12 p.

Kossmann, D., De Figueiredo, M., Petene, G., De Lima, D., 2012. Critérios morfológicos e temperatura para avaliação da germinação das sementes de cupuaçu. Revista Brasileira de Fruticultura. 34 (3). 10 p.

López, S., Gil, A., 2017. Características germinativas de semillas de *Theobroma cacao* L. (Malvaceae) “cacao”. Arnaldoa. 24 (2). 10 p.

Lovato, A., 1981. Germination of seeds. In: Advances in research and technology of seeds. Part 6. p 34.

Lucias, L., 2017. Caracterización Agromorfológica de Copoazú (*Theobroma grandiflorum* Schum.) en la Estación Experimental de Sapecho Alto Beni - La Paz. Bolivia. UMSA. 84 p.

Magnitskiy, S., Plaza, G., 2007. Fisiología de semillas recalcitrantes de árboles tropicales. Colombia. Redalyc. 9 p.

Mamani, P., 2006. Efectos de los sustratos y tratamientos pregerminativos en semillas de asaí (*Euterpe precatoria* Martius), en la comunidad Rosario del Yata, provincia Vaca Diez - Beni. Bolivua. Facultad de Agronomía. UMSA. 85 p.

MAPA, (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimiento). 2009. Regras para Análise de Sementes (RAS). Brasil. Secretaria de Defensa Agropecuaria. ISBN 1629065415. 398 p.

Megías, M., Molist, P., Pombal, M., 2018. Órganos vegetales Semilla. Universidad de Vigo, p. 6.

Muller, S., Rohsius, C., Reysdorff, C., Gasparotto, F., Lieberei, R., 2000. Anatomical and Physiological Characteristics of *Theobroma* spec. Seeds and their Relevance to Processing. Germany. University of Hamburg. 2 p.

SEED NEWS, 2015. Desafíos e oportunidades na produçao de sementes de hortaliças no Brasil. Brasil. Revista Internacional de sementes. URL http://www.seednews.inf.br/html/site/content/reportagemcapa/imprimir.php?id=224. 224 p.

Nkang, A., 2002. Carbohydrate composition during seed development and germination in two sub-tropical rainforest tree species (*Erythrina caffra* and *Guilfoylia monostylis*). J. Plant Physiol. 159: 473-483.

Ochoa, R., 2016. Diseños Experimentales. La Paz, Bolivia.

Perez, C., 2018. Conservación de semillas de algodón nativo (*Gossypium spp*.): análisis físico, fisiológico y bioquímico. Mexico. Colegio de Postgraduados. Universidad Autónoma Chapingo. 201 p.

Pro Tempore, FAO, 1999. Copoasu [*Theobroma grandiflorum* (willd. ex spreng.) shum.]: cultivo y utilización. Venezuela. Ministerio de Cooperación Técnica del Reino de los Paises Bajos. 142 p.

Rodriguez, I., Adam , G., Durán, J., 2008. Ensayos de germinación y análisis de viabilidad y vigor en semillas. España. Revista diitalizada: Agricultra agropecuaria. Universidad Politécnica de Madrid. 7 p.

Romero, E., Pelaya, W., Cristancho, A., Ortiz, M., 2020. Evaluación de la calidad de semillas de fríjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Palicero en el banco de semillas de la Universidad Libre. Colombia. ISSN: 1794-4953 e ISSN: 2619-6581. 17 (1). 15 p.

Rondón, J., Cumana, L., 2005. Revisión taxonómica del género *Theobroma* (Sterculiaceae) en Venezuela. Venezuela. Acta Botánica Venezuélica. 28 (1). 113-133 p.

Ruiz, M., 2009. El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas caso de estudio: Cebadilla chaqueña. Argentina. INTA Anguil. 20 p.

INDECOPI., (Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual). 2019. Copoazú. Perú. BIOPAT, 52 p.

Sanchez, D., Arends, E., Garay, V., 2003. Caracterización de las semillas de seis especies frutales arbóreas, usadas por la etnia piaroa en la reserva forestal Sipapo, Estado Amazonas, Venezuela. Venezuela. Forest Venez. 6 p.

Souza, A., 2007. Boas Práticas Agrícolas da Cultura do Cupuaçuzeiro. Manaus. ISSN 1685470780.

Sterling, A., Rodriguez, C., Melgarejo, L., 2015. Evaluación inicial del asocio caucho – copoazú en el Caquetá: una alternativa de enriquecimiento agroforestal con potencial para la Amazonia colombiana. Colombia. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas- “SINCHI”. 234 p.

Suarez, R., Caetano, C., Ramirez, H., Morales, J., 2012. Caracterización morfoanatómica y fisiológica de semilla sexual de pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt & Rose. Colombia. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas. 15 p.

Urano, C., Muller, C., Benchimol, R., Kouzo, A., Alves, L., 2009. Copoasu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) Shum, Cultivo y Utilización tratado de cooperación Amazónica (Pro Tempore). Venezuela. EMBRAPA. 137 p.

Valdivia, C., Figueroa, C., Flores, M., 2018. Prueba de tetrazolio en semillas de espárrago (*Asparagus officinalis* L.). Canales Científicos. 79 (2), 7 p.

Vargas, A., Bolaños, C., 1997. TCA Informes Técnicos sobre Caracterización del Banco de Germoplasma. Colombia. Instituto Amazónico de investigaciones Científicas - SINCHI. 104 p.

Velez, G., 1991. Los Frutales amazónicos cultivados por las comunidades indígenas de la región del Medio Caquetá (Amazonía Colombiana). Colombia. Revista Colombiana Amazónica. 5 p.

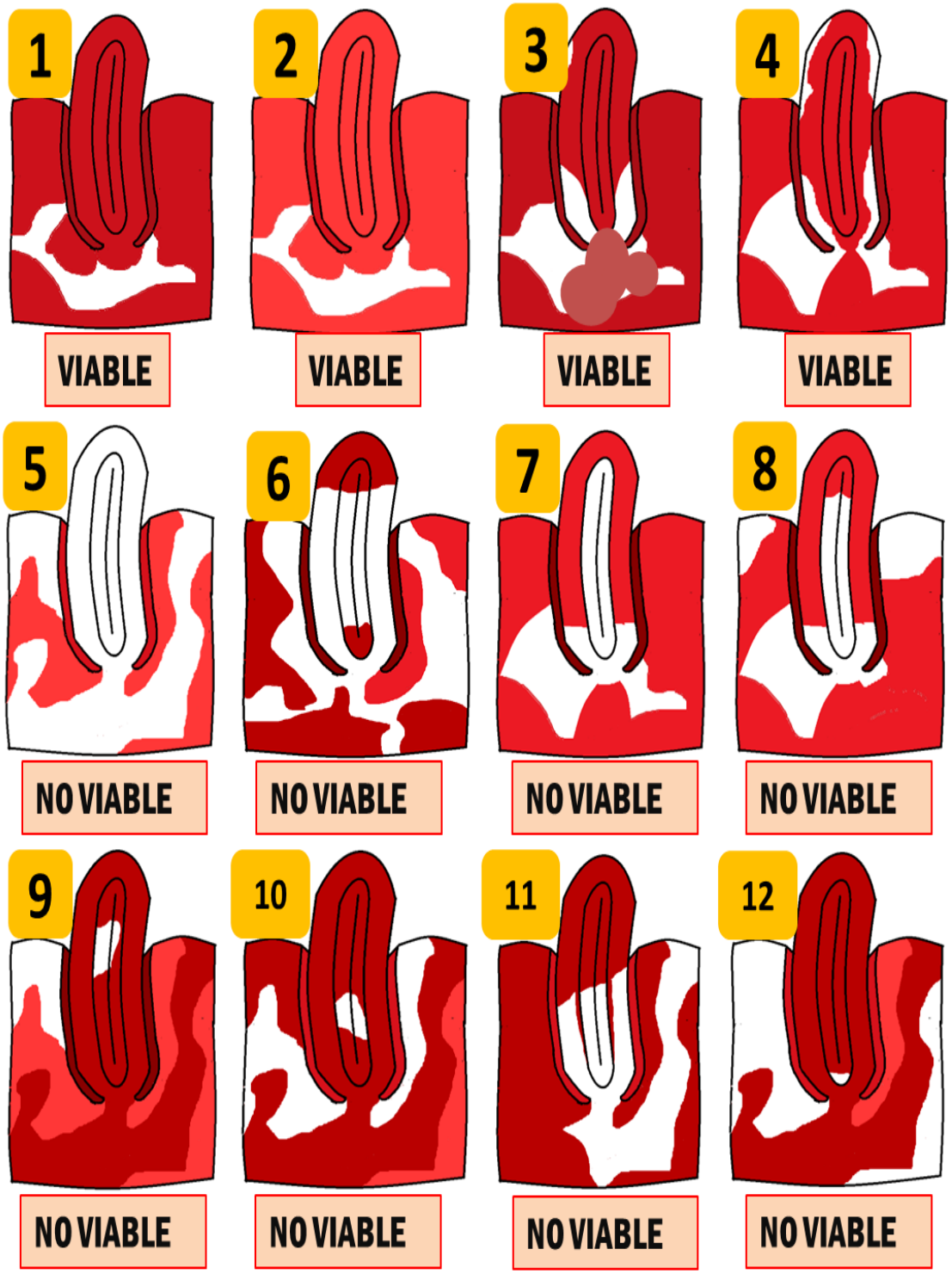
Venegas, F., 2017. Estructura del grano del café. Colombia. Coffee Media. yoamoelcafedecolombia.com.

Villachica, H., 1996. Frutales y Hortalizas Promisorios de la Amazonia. Perú. TCA PRO TEMPORE. 358 p.

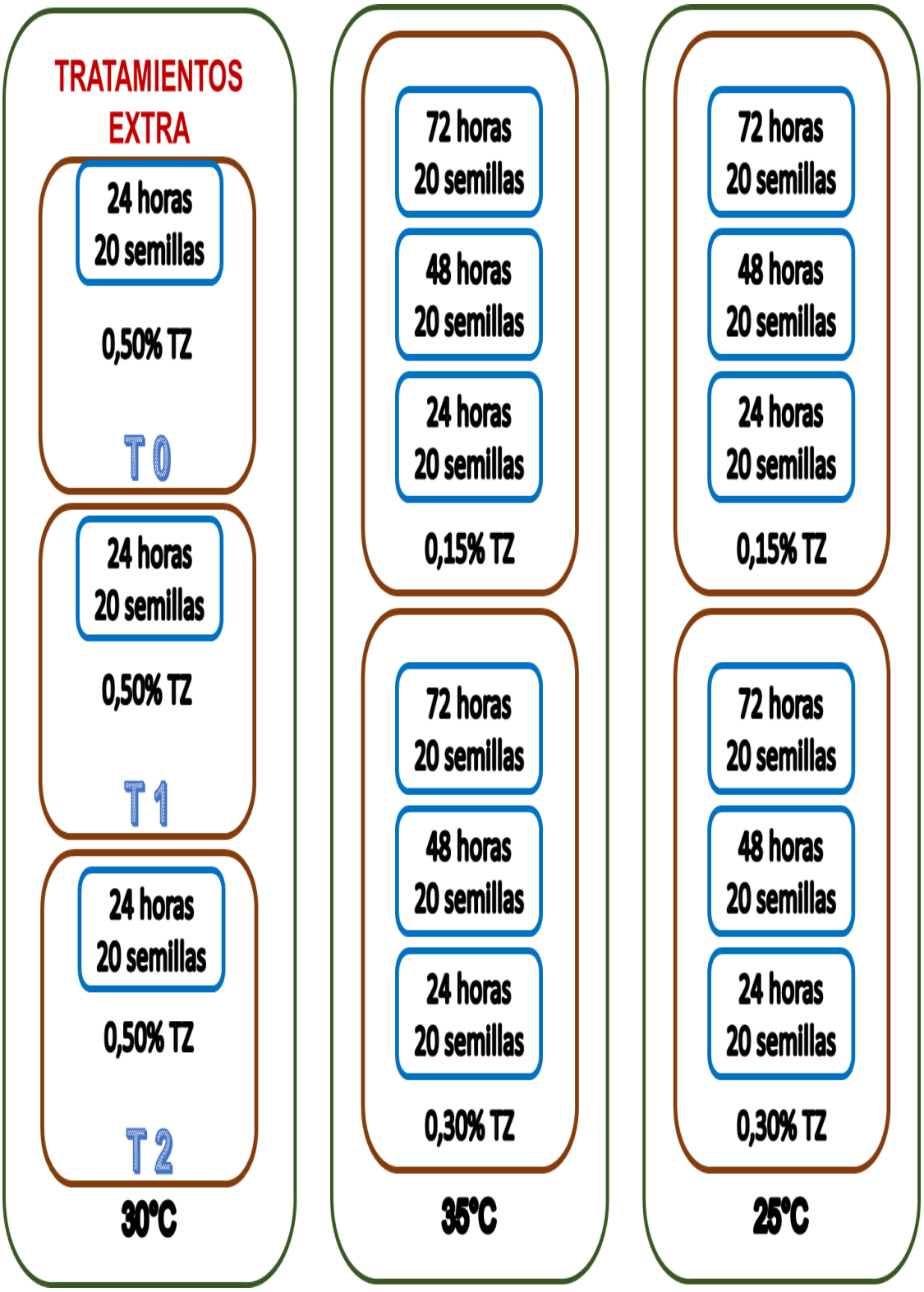
Villagra, J., Rojas, A., Montalván, P., Llave, D., Díaz, J., Chañi, L., s.f. Tecnología de procesamiento de pasta de copoazú (*Theobroma grandiflorum* Willd. ex Spreng) en Madre de Dios: Parámetros del proceso, índice de fermentación y capacidad antioxidante.. Perú. Tesis, Lic. UNAMAD. 136 p.

8. ANEXOS

Anexo 1. Mapa topográfico de viabilidad en semillas de copoazú



Anexo 2. Croquis experimental



Anexo 3. Prueba de tetrazolio en cacao (*Theobroma cacao*)

Fig. 2. Viabilidad de semillas de *T. cacao,* utilizando el reactivo 2, 3,5-trifeniltetrazolio. De acuerdo al grado de tinción del embrión, se observa: una semilla viable y de alto vigor (izquierda), una semilla viable de bajo vigor (derecha) y una semilla no viable (centro).