



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Caracterización morfoanatómica de semillas de anón (*Annona squamosa* L.) y evaluación de algunos parámetros fisiológicos del proceso de germinación y latencia

Fabio Ernesto Martínez Maldonado

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Agronomía, Escuela de Posgrados
Bogotá, Colombia

2012

**Morphoanatomic characterization of
sugar Apple (*Annona squamosa* L.)
seeds and evaluation of some
physiologic parameters of dormancy
and germination process**

Fabio Ernesto Martínez Maldonado

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Agronomía, Escuela de Posgrados
Bogotá, Colombia
2012

Caracterización morfoanatómica de semillas de anón (*Annona squamosa* L.) y evaluación de algunos parámetros fisiológicos del proceso de germinación y latencia

Fabio Ernesto Martínez Maldonado

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Agrarias, Área Fisiología de Cultivos

Director:

Ph.D. Diego Miranda Lasprilla

Codirector:

Ph.D. Stanislav Magnitskiy Valeryevich

Línea de Investigación:

Fisiología de Cultivos

Grupo de investigación: Horticultura

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Agronomía, Escuela de Posgrados

Bogotá, Colombia

2012

A mis padres, Gina, Nico y Sophie:

Si, hay un pedazo de mí en el quehacer científico,
en este tramo formal de mi camino:
la ciencia es como la música ó la poesía
solo sobre la base de la locura y la disciplina, se obtienen versos, canciones
ó documentos científicos.

El Chaski Ju.

Agradecimientos

A mi familia: Por llenarme de momentos felices, por apoyar cada uno de mis movimientos e ideas, por creer en mí pese a todas mis fallas. A mi madre, por sus cafecitos mañaneros y el desbordado amor, a mi padre por su confianza y fuerza, a mi hermana por las palabras de apoyo, a Nico y Sophie, por sus abrazos, ternura y alegría.

A mi director de tesis, Diego Miranda Lasprilla por todo su apoyo, paciencia y dedicación y por contribuir en mi formación profesional.

A la profesora Luz Marina Melgarejo, por su apoyo y confianza.

Al profeso Stanislav Magnitskiy, por su orientación.

A María Fernanda Díaz y hermana y amiga, por su amistad y apoyo incondicional en este trabajo

A Miguel Romero, hermano y amigo eterno, por su abnegada amistad y apoyo incondicional en este trabajo.

A Jennifer Blanco, por sus grandiosos aportes a mi vida sentimental, académica y laboral. Por compartir su vida conmigo.

A Diana Obregón, Julián Cárdenas, Carlos Carranza, Enrique Balaguera, Natalia Moreno, Edward Martínez, Sandra Crespo por su amistad, confianza y apoyo

A mi Alma Mater, la Universidad Nacional, sus trabajadores, docentes y estudiantes por haberme dado la oportunidad de construirme, por su maternalismo y por enseñarme a ser quien debo ser.

Resumen

Con esta investigación se buscó conocer la anatomía de la semilla de anón, los cambios morfoanatómicos y en el contenido de carbohidratos, proteína y actividad peroxidasa durante la germinación, el tipo de latencia y la respuesta a tratamientos germinativos y condiciones de almacenamiento. Se adaptó una metodología para el estudio anatómico, logrando alta calidad en los cortes. Se observó que las características anatómicas de la cubierta seminal, el endospermo y el embrión corroboran los datos reportados en la literatura para la familia Annonaceae. Se observó que la germinación de las semillas maduras de *A. suamosa* L. es un proceso que se presenta en dos etapas separadas y consecutivas: la ruptura de la testa y posteriormente la ruptura del endospermo. La sacarosa fue el azúcar más acumulado en las semillas sin germinar y el más utilizado en el proceso de germinación de semillas de *A. squamosa* L. En las semillas imbibidas se observó alta actividad enzimática la cual fue 9 y 13 veces mayor que la encontrada en las semillas con ruptura de testa y protrusión de radícula. La proteína disminuyó en la ruptura de la testa mientras que en el proceso de ruptura del endospermo y protrusión de la radícula el contenido de proteína se incrementa. El máximo porcentaje de germinación se obtuvo a una temperatura constante de 35 °C para las semillas provenientes de Cundinamarca y Tolima (58 y 57% respectivamente), igualmente, a esta temperatura se observó un menor TMG, una mayor VMG y un índice de sincronización más bajo. Todos los tratamientos de GA₃ sobre las semillas incrementaron los PG en cada punto del tiempo de incubación. En particular la concentración de 600 mg/kg generó las mejores respuestas de PG, TMG, VMG y E. Se postula la hipótesis de que las semillas de *A. squamosa* L. presentan características de una latencia morfofisiológica compleja no profunda. Se determinó que la temperatura ambiente durante 60 y 120 días es la más adecuada para el almacenamiento, ya que se observan altos valores de PG (>80%), VMG (>0,15 semillas germinadas/día), menores TMG (< 7 días) y altos niveles de sacarosa (incremento del 72,3%) lo cual es debido a una posible superación de la latencia presente de forma natural, lo que garantiza germinabilidad durante el periodo de almacenamiento de *A. squamosa* L.

Palabras clave: cubierta seminal, embrión, endospermo, temperatura, ácido giberélico, peroxidasa, sacarosa.

Abstract

This study aimed to know the anatomy of sugar apple seed, and carbohydrate, morphoanatomic, protein and peroxidase activity changes during germination, the kind of dormancy and germination response to treatments and storage conditions. We adapted a methodology for anatomical study, achieving high quality cuts. It was observed that the anatomical features of the seed coat, endosperm and embryo corroborate the data reported in family Annonaceae literature. It was observed that germination of mature seeds of *A. squamosa* L. is a process that occurs in two separate and consecutive stages: the seed coat rupture and later the endosperm rupture. The sucrose was the main sugar accumulated in ungerminated seeds and the most used in germination process of seed of *A. squamosa* L. In imbibition the peroxidase enzyme activity was 9 and 13 times higher than that found in the seeds with seed coat rupture and radicle protrusion. The protein content decreased in seed coat rupture while in breaking the endosperm process and radicle protrusion the protein content increases. The maximum percentage of germination was obtained at a constant temperature of 35 ° C for seeds from Cundinamarca and Tolima (58 and 57% respectively), also, this was a lower temperature TMG, VMG and greater synchronization index lower. All GA3 treatments increased the PG on at each point of incubation time. 600 GA3 mg / kg produced the best responses of PG, TMG, VMG and E. It is hypothesized that the seeds of *A. squamosa* L. exhibit features a complex morphophysiological non deep dormancy. It was determined that the room temperature for 60 and 120 days is the most suitable for storage, due to we observed high values of PG (> 80%), VMG (> 0.15 sprouts / day), lower TMG (<7 days) and high levels of sucrose (72.3% increase) which is due to a possible natural broke of the dormancy present in the seeds, which ensures germination during storage period of *A. squamosa* L.

Key words: seed coat, embryo, endosperm, temperature, gibberellic acid, peroxidase, sucrose.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XV
Introducción	1
1. Anatomía de semillas de <i>Annona squamosa</i> L. (Annonaceae).....	11
1.1 Metodología.....	13
1.2 Resultados y discusión	15
2. Cambios morfoanatómicos y en el contenido de carbohidratos, proteínas y actividad peroxidasa durante la germinación de semillas de anón (<i>Annona squamosa</i> L.) (Annonaceae).....	28
2.1 Metodología.....	32
2.2 Resultados y discusión	36
3. Caracterización del fenómeno de latencia en semillas de anón (<i>Annona squamosa</i> L.) (Annonaceae) mediante la aplicación de diferentes tratamientos pregerminativos	51
3.1 Metodología.....	55
3.2 Resultados.....	61
3.3 Discusión	84
4. Efecto del almacenamiento sobre la germinación, contenido de proteína y carbohidratos solubles en semillas de anón (<i>Annona squamosa</i> L.) (Annonaceae).....	92
4.1 Metodología.....	95
4.2 Resultados.....	98
4.3 Discusión	103
5. Conclusiones.....	108
Bibliografía	113

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Cubierta seminal de <i>A. squamosa</i> L.	16
Figura 1-2. Tipos y parte del fruto de Sección longitudinal de endotesta y ruminaciones de <i>A. squamosa</i> L.	17
Figura 1-3. Sección longitudinal del integumento interno y endospermo ruminado de <i>A. squamosa</i> L.	18
Figura 1-4. Región micropilar de <i>A. squamosa</i> L.	19
Figura 1-5. Endospermo de <i>A. squamosa</i> L.	24
Figura 1-6. Embrión de semillas de <i>A. squamosa</i> L.	27
Figura 2-1. Germinación en dos etapas de semillas de <i>A. squamosa</i> L.	37
Figura 2-2. Semilla madura y primera etapa de germinación de semillas de <i>A. squamosa</i> L.	38
Figura 2-3. Formación de raíces laterales en semillas con protrusión de radícula.	39
Figura 2-4. Sección longitudinal de embrión, endospermo micropilar y plug micropilar en el proceso de germinación.	40
Figura 2-5. Cambios morfológicos en el endospermo de <i>A. squamosa</i> L.	41
Figura 2-6. Cambios en la concentración (ug/mg de materia fresca) de azúcares solubles en embrión y endospermo de <i>A. squamosa</i> L.	43
Figura 2-7. Cambios en la concentración (ug/mg materia fresca) de sacarosa (A), Glucosa (B) y Fructosa (C) en embrión y endospermo de semillas de <i>A. squamosa</i> L.	45
Figura 2-8. Cambios en los contenidos (ug/mg materia fresca) de proteína en semillas de <i>A. squamosa</i> L.	48
Figura 2-9. Cambios en la actividad enzimática peroxidasa ($\Delta A_{460}/\Delta \text{min} \cdot \text{mg prot.}$) en semillas de <i>A. squamosa</i> L.	49
Figura 3-1. Descriptores de fruto para las accesiones de <i>Annona squamosa</i> L.	57
Figura 3-2. Cortes evaluados en la prueba de viabilidad de semillas de anón.	62
Figura 3-3. Patrones de tinción del embrión en la prueba de viabilidad de semillas de anón.	62
Figura 3-4. Curva de secado de semillas de anón, para las localidades de Apulo, Cundinamarca y Castilla, Tolima.	63
Figura 3-5. Efecto de las temperaturas sobre el porcentaje de germinación (PG), tiempo medio de germinación (TMG), velocidad media de germinación (VMG) y sincronización (E) en semillas de <i>A. squamosa</i> L.	65
Figura 3-6. Porcentajes de germinación acumulada (PG) de semillas provenientes de Apulo, Cundinamarca, incubadas durante 30 días en turba húmeda bajo tres regímenes de temperatura.	66

Figura 3-7. Porcentajes de germinación acumulada (PG) de semillas provenientes de Castilla, Tolima, incubadas durante 30 días en turba húmeda bajo tres regímenes de temperatura.	66
Figura 3-8. Incremento del peso fresco en semillas con y sin testa de <i>Annona squamosa</i> L. obtenidas de Apulo, Cundinamarca, durante el proceso de imbibición en tres regímenes de temperatura, 30°C, 35°C y T° ambiente (media: 18,7; máxima: 22,9; mínima: 17,3).....	68
Figura 3-9. Incremento del peso fresco en semillas con y sin testa de <i>Annona squamosa</i> L. obtenidas de Castilla, Tolima, durante el proceso de imbibición en tres regímenes de temperatura, 30°C, 35°C y T° ambiente (media: 18,7; máxima: 22,9; mínima: 17,3).....	69
Figura 3-10. Efecto de diferentes métodos de escarificación sobre el porcentaje de germinación (PG), tiempo medio de germinación (TMG), velocidad media de germinación (VMG) y sincronización (E) en semillas de <i>A. squamosa</i> L.	73
Figura 3-11. Efecto del tratamiento de imbibición en una solución de agua + GA ₃ , sobre la germinación acumulada de semillas de <i>Annona squamosa</i> L. provenientes del municipio de Castilla, Tolima.....	76
Figura 3-12. Efecto del tratamiento de imbibición en una solución de agua + GA ₃ , sobre la germinación acumulada de semillas de <i>Annona squamosa</i> L. provenientes del municipio de Apulo, Cundinamarca.....	78
Figura 3-13. Efecto de diferentes concentraciones de GA ₃ sobre el porcentaje de germinación (PG), tiempo medio de germinación (TMG), velocidad media de germinación (VMG) y sincronización (E) en semillas de <i>A. squamosa</i> L.	82
Figura 3-14. Efecto de tres periodos de estratificación caliente (25°C) húmeda sobre el porcentaje de germinación (PG), tiempo medio de germinación (TMG), velocidad media de germinación (VMG) y sincronización (E) en semillas de <i>A. squamosa</i> L.	84
Figura 4-1. Cambios en el contenido de humedad de semillas de <i>A. squamosa</i> L. provenientes de Castilla (Tolima) y Apulo (Cundinamarca).	99
Figura 4-2. Porcentaje de germinación (A), velocidad media de germinación (B), tiempo medio de germinación (C) y contenido de proteína soluble (D) de semillas de <i>A. squamosa</i> L. provenientes de Castilla, Tolima y Apulo, Cundinamarca durante cuatro períodos de almacenamiento en condición ambiental CA, cuarto frío CF y refrigerador R.	102
Figura 4-3. Cambios en la concentración (ug/mg materia fresca) de sacarosa, glucosa y fructosa en semillas de <i>A. squamosa</i> L. sin almacenar (0 días) y almacenadas durante 120 días en condición ambiental CA, cuarto frío CF y refrigerador R.	102

Lista de tablas

Pág.

Tabla 3-1. Variables climáticas de las zonas de colecta, Apulo (Cundinamarca) y Castilla (Tolima).....	56
Tabla 3-2. Descriptores de pasaporte de las accesiones de <i>Annona squamosa</i> L. Seleccionadas.	56
Tabla 3-3 Formulas empleadas para el cálculo de variables de germinación.	60
Tabla 3-4. Porcentaje de Incremento en el peso fresco de semillas de <i>Annona squamosa</i> L. con y sin testas a los 144 días de imbibición en agua en tres regímenes de temperatura.....	69
Tabla 3-5. Puntos de inflexión calculados obtenidos de las curvas de imbibición de semillas de <i>Annona squamosa</i> L. con provenientes de Apulo, Cundinamarca, con y sin testas, durante 144 días de imbibición en agua en tres regímenes de temperatura.	70
Tabla 3-6. Puntos de inflexión calculados obtenidos de las curvas de imbibición de semillas de <i>Annona squamosa</i> L. con provenientes de Castilla, Tolima, con y sin testas, durante 144 días de imbibición en agua en tres regímenes de temperatura.....	71
Tabla 3-7. Significancia de la prueba F para escarificación mecánica en el porcentaje de germinación (PG), tiempo medio de germinación (TMG), velocidad media de germinación (VMG) y sincronización (E) en semillas de <i>A. squamosa</i> L.....	72
Tabla 3-8. Significancia de la prueba F para el efecto del tratamiento con GA ₃ sobre el porcentaje de germinación (PG), tiempo medio de germinación (TMG), velocidad media de germinación (VMG) y sincronización (E) en semillas de <i>A. squamosa</i> L.....	79
Tabla 3-9. Significancia de la prueba F para el efecto del tratamiento de estratificación caliente húmeda por 15, 30 y 45 días en el porcentaje de germinación (PG), tiempo medio de germinación (TMG), velocidad media de germinación (VMG) y sincronización (E) en semillas de <i>A. squamosa</i> L.	83
Tabla 4-1. Fórmulas empleadas para el cálculo de variables de germinación. Ranal y Santana (2006).....	97

Introducción

Annonaceae es una familia de árboles de zonas bajas que crecen principalmente en el sotobosque, aunque algunas especies de *Duguetia*, *Guatteria* y *Xylopia* son componentes del dosel y otras como *Annona hypoglauca* y *Annona scandens* son bejucos (Murillo y Restrepo, 2000). Se caracteriza porque la corteza externa se desprende en tiras y la corteza interna es reticulada; las hojas son simples, dísticas, enteras y generalmente aromáticas; las flores son solitarias o reunidas en cimas helicoides con todas las ramas en un mismo plano, llamadas ripidios; el perianto es trímero y generalmente con dos verticilos de pétalos. Los estambres son numerosos, los carpelos libres y los frutos generalmente apocárpicos (Murillo, 2001).

La familia Annonaceae comprende aproximadamente 2500 especies distribuidas pantropicalmente bajo los 2000 msnm en 140 géneros. Tres géneros producen frutos comestibles, pero los más importantes son *Annona* y *Rollinia* (Sanjinés et al., 2006). El género *Annona* agrupa 150 especies, pero las de mayor importancia económica son *Annona squamosa* L, *A muricata* L, *A cherimola* Mill y el híbrido Atemoya (*A. squamosa* x *A. cherimola*); estos frutos son buena fuente de vitamina A, Hierro y calorías (Guerrero y Fischer, 2007), además producen aceites esenciales y medicinales, e incluso se han aislado componentes antitumorales relacionados con cáncer de próstata y seno (Ojeda, 2005).

Se reconocen ciertas especies con propiedades anticancerígenas e insecticidas novedosas y otras se caracterizan por sus fibras resistentes y algunas como *Rollinia mucosao* (anón amazónico) por sus exquisitos frutos. Por medio de la aproximación etnobotánica en las comunidades Uitoto con énfasis en la región amazónica (Araracuara y Leticia) se conoció la forma de aprovechamiento de los recursos, entre ellos de las anonáceas. Además se reportan los géneros y las especies para Colombia y Amazonas cada una con un perfil monográfico, concluyendo que de 137 especies para Amazonas, 72 (52.5%) tienen algún potencial de uso, siendo las categorías más importantes: Fibras 21.2 %, medicinal 18.2%, construcción 16.8% y alimenticia 11.7% (Cooper et al., 2001).

Las principales especies comerciales son la chirimoya (*Annona chirimoya* Mill.), el híbrido atemoya (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.), el anón (*Annona squamosa* L.) y la guanábana (*Annona muricata* L.). La chirimoya es nativa de las tierras altas subtropicales de Perú y Ecuador, y se cultiva comercialmente en Chile, España,

California y Nueva Zelanda (George y Nissen, 1993). La Atemoya es un híbrido y al parecer un intermedio en las características morfológicas y necesidades climáticas de sus padres. Se cultiva carencialmente en Florida (USA) y Australia (George et al., 1987). La guanábana se distribuye en regiones tropicales de América Central y este de India (Popenoe, 1974).

El anón es la especie más ampliamente distribuida del género *Annona* en el mundo. Se cultiva en la zona tropical de Suramérica, en el sur de México, el occidente de la India, Bahamas, Bermuda, y en el sur de la Florida. En las zonas cálidas tropicales de América, Jamaica, Puerto Rico, Barbados, el sur de la India y en las regiones secas del norte de Queensland, Australia, se encuentra en forma silvestre en praderas y bosques (Rajput, 1985; Morton, 1987; Hoyos, 1989). El cultivo es extenso en India, mientras que en Brasil es uno de los frutos más importantes, siendo llamativo en los mercados de Bahía.

Es un árbol semicaducifolio de porte bajo o arbusto de 3 a 7 m de altura, con copa esparcida o abierta, formada por ramas que crecen en forma irregular. Los brotes jóvenes crecen en zigzag y son grisáceo-cerosas con muchas lenticelas rugosas. Estos son densamente pubescentes y las partes más antiguas lisas. Todas sus partes son olorosas al triturarlas (Hoyos, 1989). El árbol presenta un sistema radical bastante superficial y ramificado, pudiendo originar dos o tres pisos o planos de raíces a diferentes niveles, pero poco profundos (Gardiazábal y Rosenberg, 1988). El anón ramifica cerca a la base y posee un tallo con una corteza externa de color castaño, desde lisa hasta agrietada; la corteza interna es amarillo-claro, algo amarga. La madera es blanda (Hoyos, 1989).

Las hojas son sencillas, alternas, elípticas o elíptico-lanceoladas y con margen entero, de 5 a 11 cm de largo por 2 a 5 cm de ancho, subagudas en el ápice, cuneiformes en la base; a veces ligeramente asimétricas; grisáceo-cerosas cuando jóvenes, negruzcas al secarse, verde oscuro en la cara superior y verde-azul-pálido en la inferior, lisas en los bordes. Por el haz son glaucas, mientras que por el envés son pubescentes. Los pecíolos tienen una longitud de 5 a 12 mm y estos son huecos en su unión con el tallo, protegiendo las yemas que continúan su desarrollo cuando las hojas caen (Franciosi, 1992).

Las flores son péndulas, axilares, hermafroditas y por lo general solitarias aunque pueden crecer en grupos de dos a cuatro opuestos a las hojas; fragantes y de coloración verde en la parte externa y crema en la parte interna. Presentan seis pétalos en dos series: los externos lineal-oblongos, obtusos, de 1 a 3 cm de largo, carnosos; los pétalos internos son rudimentarios, de más o menos 1 mm de largo (Hoyos, 1989). El gineceo apocárpico está compuesto por más de 100 carpelos, con ovario súpero y estigma simple. El androceo está formado por más de 100 estambres libres. Las estructuras reproductivas están dispuestas en forma de espiral sobre un receptáculo floral. En la región basal de los pétalos, hay una cavidad en la cual se encuentran glándulas

secretoras, formando una cámara floral, que sirve como refugio y fuente de alimento para los polinizadores (Gardiazábal y Rosenberg, 1988).

Los frutos son globosos-oviformes, casi de forma acorazonada, de 5 a 12 cm de diámetro y un peso de 200 a 800 g. Es de color verde-amarillento pero se conocen variedades de color púrpura. Externamente la unión de los carpelos es laxa, con toda su superficie marcadamente prominente, dándole al fruto apariencia tuberculada. La pulpa es blanca o amarillenta entre la unión de los carpelos; los frutos son del tipo sincarpo formados por numerosos pistilos de una flor; cada escama pertenece a un carpelo fecundado. La pulpa es blanco-amarillenta, dulce y aromática, mantecosa, comestible, de agradable sabor (Nakasone y Paull, 1998; Navarro, 2001).

Los frutos se consumen principalmente frescos, ya que tienen un sabor cremoso y dulce; son muy nutritivos, ricos en azúcares, proteínas y fósforo, con una pulpa muy digestiva, por lo que se recomienda en la dieta de niños y ancianos. También se utilizan en postres y en la elaboración de jugos, refrescos, zumos, sorbetes, vinos, helados y bebidas espirituosas (Navarro, 2001). La decocción de las flores se usa para combatir el reumatismo mediante baños en la frente (Hoyos, 1989). El té obtenido de las raíces sirve como purgante mientras que el que se hace con las hojas es ligeramente laxante. El fruto verde, muy astringente, es empleado contra la diarrea (Leal, 1990). El fruto verde desecado, las semillas y las hojas pulverizadas se utilizan como insecticidas. La cáscara, las hojas, los tallos y las semillas contienen fibras, aceites y varios alcaloides, los cuales tienen aplicaciones insecticidas, fungicidas, medicinales e industriales (Rajput, 1985; Morton, 1987).

Las semillas son negro-lustrosas o café-oscuras, de 1,25 cm de longitud y constituyen entre el 31% y 41% del total del fruto y contienen entre 14 y 49% de aceite (Leal, 1990). Son de forma elipsoidal y con un contorno redondeado. La cubierta seminal es gruesa. El endospermo es muy abundante, irregular y ruminado y sus ruminaciones son generalmente transversales al eje longitudinal de la semilla. El embrión es pequeño y de lento desarrollo, está situado cerca del hilo. En el momento de la germinación la semilla se divide parcialmente de forma longitudinal a lo largo de los lados más estrechos, en donde la radícula crece de forma recta hacia abajo Corner (1949).

El gran tamaño de la semilla, como en anón, está relacionado con el hábito de árboles tropicales. Se ha sugerido que el tamaño de las semillas tiene una gran importancia filogenética. Generalmente las semillas más grandes tienen embriones más desarrollados por lo que germinan fácilmente, sin embargo *A. squamosa* es una de las excepciones conocidas. En las semillas de esta planta el diminuto y poco desarrollado embrión está incrustado en un abundante endospermo. Se ha postulado que un embrión no diferenciado de este tipo es un rasgo primitivo. Debido a la tasa lenta de crecimiento del embrión, la semilla tarda de 1 a 3 meses en germinar (Hayat, 1963).

El tipo de ruminal del endospermo es característico de las anonáceas. Eames (1961), ha declarado que, en algunos taxones, esta condición es el resultado de la intrusión del endospermo en expansión dentro de la nucela y, en otros grupos taxonómicos, por las invaginaciones nucelares o tejidos tegumentarios en el endospermo. Corner (1949), ha indicado que en el caso de semillas anonáceas el endospermo se expande en la nucela, debido a que en la nucela se desarrollan ruminaciones como resultado de la invaginación de los integumentos mucho antes el desarrollo del endospermo.

No se conoce con exactitud el lugar de origen del anón. Antes se creía que era nativo de la India, pero datos históricos y filológicos tienden a confirmar que es de origen americano (Rajput, 1985). Probablemente es nativo de las regiones tropicales de Centroamérica o las Antillas (Morton, 1987). Esta especie crece desde el nivel del mar hasta los 1000 msnm (Hoyos, 1989), no requiere de periodos fríos por lo que se desarrolla y crece bien en condiciones relativamente estables de temperatura (George y Nissen, 1987). La temperatura mínima conveniente se encuentra en un rango de 10 a 20°C y la máxima de 22 a 28°C (Guerrero y Fischer, 2007).

Es la anonácea más resistente al frío, junto con la chirimoya (Navarro, 2001), aunque los árboles jóvenes no toleran temperaturas bajo 0°C los árboles adultos muestran cierta tolerancia a las heladas (Campbell y Phillips, 1994). Soporta además periodos prolongados de sequía y es probablemente la anonácea más tolerante a esta. Para su desarrollo requiere de una precipitación anual entre 750 y 1200 mm (Guerrero y Fischer, 2007).

El anón tolera suelos pobres, pedregosos, semiáridos y con pH de 7 a 8, por lo que puede ser utilizado en la producción por injerto de otras anonáceas. Puede establecerse en una gran variedad de suelos, desde arenosos hasta franco arcillosos, aunque la calidad de la cosecha depende en gran medida de la fertilidad del suelo, siendo los suelos arenosos o francos arenosos, profundos y de pH neutro o ligeramente alcalino los mejores para la producción (Nakasone y Paull, 1998).

El anón en Colombia presenta, según testimonios de agricultores e investigadores en frutales, una considerable variabilidad genética ya que la mayoría de las poblaciones se encuentran en estado silvestre y los cultivos existentes en la actualidad han partido de semilla sexual recolectada de dichas poblaciones (Morton, 1987; Nakasone y Paull, 1998; Cruz, 2002).

El cultivo del Anón en Colombia es poco tecnificado y los cultivos extensivos establecidos son escasos, de allí la importancia de una iniciativa que genere métodos de propagación efectivos con los que el productor mejore las condiciones de establecimiento y manejo del cultivo. Actualmente no se han alcanzado resultados óptimos mediante propagación asexual, por lo tanto se debe hacer énfasis en la investigación de técnicas que mejoren el potencial germinativo de la especie, así como en recomendaciones para el almacenamiento de semillas a largo plazo (Guerrero y Fisher, 2007).

Uno de los problemas del cultivo es la pobre e impredecible germinación de sus semillas, la germinación de semillas recién cosechadas puede ser altamente variable en un rango del 30 al 80 % (George y Nissen, 1979). La mayoría de las semillas tienen un período relativamente largo de viabilidad, pero requieren de 1 a 3 meses para germinar y la escarificación y estratificación no mejoran la germinación (Jubes *et al.*, 1975; Vargas, 1986), por el contrario se ha reportado que el ácido giberélico y las altas temperaturas muestran una mejora en la germinación de las semillas (Wunkshaus, 1990).

Al respecto, se ha indicado que la latencia no está asociada únicamente con la ausencia de germinación y que más bien está relacionada con los atributos de la semilla que determinan las condiciones requeridas para que proceda la emergencia del embrión (Fenner y Thompson, 2005). En línea con lo anterior Koornneef *et al.* (2002) afirmaron que la latencia y la germinación son determinadas por una interacción entre el potencial de crecimiento del embrión y las restricciones impuestas por los tejidos que rodean éste.

En diversos géneros y especies de la familia Annonaceae, se ha reportado la presencia de latencia morfológica y morfofisiológica (Baskin y Baskin, 2001). La primera ocurre en semillas con embriones rudimentarios y laminares, en las cuales la mayoría de la semilla está ocupada por el endospermo (semillas endospermicas) y el embrión corresponde aproximadamente a un 1% del volumen de la unidad de propagación sexual (Nikolaeva, 1977); estos presentan diferenciación, sin estar latentes y simplemente necesitan tiempo para crecer y germinar (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). En la segunda, adicionalmente al embrión rudimentario, un mecanismo fisiológico inhibe la germinación de la semilla (Baskin y Baskin, 2001; Baskin y Baskin, 2004), por lo cual hay que emplear protocolos de estratificación, los que, en algunos casos, pueden remplazarse por aplicación de ácido giberélico, AG₃, (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

En el contexto anterior, se ha reportado latencia morfológica en Annonaceae de los géneros *Cyathocalix*, *Rollinia* y *Annona* (*Annona squamosa* y *Annona cracifolia*) y morfofisiológica en taxa de los géneros *Goniothalamus*, *Mitrephora*, *Monocarpia*, *Paeaanthus*, *Polyanthia*, *Xylophia*, *Unonopsis* y *Annona*, específicamente en *Annona coriaceae* y *Annona spraguei* (diversos autores, citados por Baskin y Baskin, 2001). Igualmente, se ha encontrado latencia fisiológica y embriones inmaduros en *Annona crasiflora* (Da Silva *et al.*, 2007). Con relación a los taxa cultivados de *Annona*, se ha señalado que las semillas presentan generalmente una germinación irregular, lo que dificulta la propagación sexual (Pinto, 2005; Padilla y Encina, 2003). Igualmente, se ha afirmado que este tipo de comportamiento es debido a diferentes niveles de latencia (Ferreira *et al.*, 1999; Pinto, 1975), con reportes no concordantes sobre la presencia o ausencia de ésta, lo cual ha sido atribuido, por Pinto (2005), al grado de madurez de la semilla en los diversos trabajos y que ésta puede ser inducida por factores climáticos, en lugar de ser innata.

Con base a la apertura de nuevos mercados y a la apetencia de países industrializados por cada vez más frutos exóticos de origen tropical, las especies de frutales nativos subexplotadas en Colombia toman fuerza como una alternativa de producción agrícola normalmente para zonas difíciles en relación a sus condiciones ambientales o sociales. Este es el caso del anón (*Annona squamosa* L.), pues a pesar de que aún no se exporta oficialmente, en la opinión de expertos en frutas promisorias, es un fruto de alto potencial de mercado en el exterior. En el mercado nacional, el anón es de alta demanda y alto precio, bordeando los \$4.000 por kg. Esto explica el amplio margen de intervención en prácticas adecuadas de mercadeo, lo cual permite mejorar significativamente el precio al productor. Por otro lado, el anón presenta posibilidades reales en el mercado internacional, prueba de ello es el interés de la Corporación Colombia Internacional y exportadoras como "El Tesoro Fruit", quien ha enviado las primeras muestras a Alemania (Material de Siembra y Mejoramiento Genético del Anón (*Annona squamosa* L. 2011).

Pese al gran potencial que representa esta especie frutícola, es poco el manejo que se le da al cultivo, debido a que no se conocen las tecnologías de producción. Además, la expansión del cultivo está limitada por la poca información existente sobre la especie, principalmente en relación a aspectos biológicos, botánicos y agronómicos (Pinto y Genú, 1984).

En Colombia se encuentra en la Costa Atlántica y en las zonas secas de los valles interandinos, en los departamentos de Valle, Caldas, Huila, Tolima, Cundinamarca, Meta y los santanderes, entre los 450 y 1.500 msnm (Loteró, 1976). En general hay pocos cultivos comerciales establecidos sin embargo es un cultivo de importancia a nivel local en los lugares en donde se produce aunque no es comercializado en grandes volúmenes.

Teniendo en cuenta las ventajas comparativas que ofrecen cada núcleo productivo en relación con su oferta agroambiental, se hace necesario implementar métodos de propagación efectivos y eficientes de material de siembra para anón que potencien el desarrollo de cultivo en zonas potencialmente aptas. Así mismo se requiere generar conocimiento relacionado con las semillas y su comportamiento germinativo con el objetivo de apoyar el establecimiento, mantenimiento y monitoreo bancos de germoplasma, todo esto con el fin de desarrollar estrategias de manejo de la especie que ayuden a incrementar las áreas de siembra y sus rendimientos.

En Colombia no se han desarrollado estudios referidos a la caracterización anatómica de los materiales de siembra comerciales de anón así mismo la información relacionada con el comportamiento fisiológico de la semilla en los procesos de germinación y latencia, es muy diversa, limitada y generada en otras condiciones ambientales, lo cual limita el desarrollo de prácticas de propagación y conserva de material genético.

Con el desarrollo de la presente investigación se contribuirá con el desarrollo de prácticas encaminadas a la conserva de material genético, manejo de semilla para efectos de

propagación, producción y acondicionamiento de semillas en general, mediante la implementación de técnicas para mejorar el potencial germinativo de la especie, recomendaciones para el almacenaje de semilla a largo plazo y el desarrollo protocolos de medición de viabilidad, germinación entre otras, que permitan el establecimiento y mantenimiento de un banco de semillas.

Con los resultados se espera beneficiar a la población de productores de la especie, así como instituciones de investigación que direccionen sus esfuerzos en desarrollar este cultivo que según reportes del Ministerio de Agricultura y desarrollo rural es una especie exótica promisoría con miras a exportación y con un gran potencial.

Literatura Citada

- Baskin, C.C. y J.M. Baskin. 2001. Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press, San Diego, California. 666 p.
- Baskin, J.M. y C.C. Baskin. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* 14, 1-16.
- Campbell, C. y R. Phillips. 1994. The sugar apple. Horticultural Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Cooper, H.D., C. Spillane y T. Hodgkin. 2001. Broadening the genetic base of crops: an overview. pp. 1-23. En: Cooper H.D., C. Spillane y T. Hodgkin (eds.). Broadening the genetic base of crop production. IPGRI, FAO, CABI Publishing, Wallingford.
- Corner, E. J. H. 1949. The durian theory of the origin of the modern tree. *Ann. Bot.* 13:367-414.
- Cruz, E. 2002. Cultivo de Anona. Boletín Técnico No. 7. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal, CENTA, El Salvador. 20 p.
- Da Silva E.A.A., D.L.B. De Melo, A.C. Davide, N. De Bode, G.B. Abreu, J.M.R. Faria y H.W.M. Hilhorst. 2007. Germination ecophysiology of *Annona crassif lora* seeds. *Ann. Bot.* 99, 823-830.
- Eames, A. J. 1961. Morphology of the Angiosperms. McGraw-Hill Book Company, New
- Franciosi, R. 1992. El cultivo del chirimoyo en el Perú. Primera edición. Ediciones Fundeagro, Perú. 108 p.
- Fenner, M. y K. Thompson. 2005. The ecology of seeds. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ferreira, G.Z., L.A. Fogaça y M.M. Malavasi. 1999. Germinación de semillas de *Annona squamosa* L., sometidas a diferentes tiempos y concentraciones de ácido giberélico. En: Memorias del II Congreso Internacional de Anonáceas. Universidad de Ciencias y Artes del Estado de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. pp. 79.
- Finch - Savage, W.E. y G. Leubner-Metzger. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171, 501-523.
- Gardiazábal, F. y M. Rosenberg. 1988. Cultivo del chirimoyo. Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Chile, Chile. 112 p.
- Guerrero. E. y Fisher. G. 2007. Manejo integrado en el cultivo de anón (*Annona squamosa* L.). *Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas*. Vol. 2 - No.1 - pp. 154-169.

- George. A.P y R. Nissen. 1993. Annonaceous. In: R. Macrae. R.K. Robison y M.I. Sadla (Editors). *Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nuttitkim*. Academic Press, London, pp. 198-199.
- George. A.P. 1985. Custard apple. In: P. Page (Editor) . *Tropical Tree Fruits for AUS. Itali*. Queensland Department of Primary Industries. Hrisbane. pp. 3.s-41.
- Hoyos, J. 1989. *Frutales en Venezuela*. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Monografía 36, pp. 35–48.
- Hayat, M.A. 1963. Morphology of seed germination and seedling in *Annona squamosa*. *Botanical Gazette*, v.124, p.360-362.
- Jubes, JT., H. Martinez, E. Padilla, C. Oeste. 1975. Effects of mechanical scarification , substrate, seed position and gibberellic acid on germination of cherimoya. *Rev. Agron. Noreste Argent.* 12, 161.
- Koornneef, M., L. Bentsink y H. Hilhorst. 2002. Seed dormancy and germination. *Current Opinion. Plant Biol.* 5, 33-36.
- Leal, F. 1990. Sugar Apple. pp. 149–158. En: Nagy, S., P. Shaw, y W. Wardowski (eds.). *Fruits of tropical and subtropical origin. Composition, properties and uses*. Florida Science Source, Lake Alfred, Florida
- Lotero B. 1976. Géneros de la flora de Colombia. III. Trabajo de grado en Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 175pp.
- Murillo, J. 2001. Las Annonaceae de Colombia. *Biot. Col.* 2 (1) 49 – 58
- Murillo J., D. Restrepo. 2000. Las anonáceas de la región de Araracuara: Estudios en la Amazonía Colombiana. XX Soporte Editorial, Bogotá, 218 pp.
- Morton, J. 1987. Sugar apple (*Annona squamosa*). pp. 69-72. En: Morton, J. (ed.). *Fruits of warm climates*. Creative Resources Systems, Miami.
- Nakasone, H. y R. Paull. 1998. Tropical fruits. *Crop production science in horticulture series*. CAB International, Londres. pp. 45-75.
- Navarro, J. 2001. *Guía de las frutas cultivadas. Identificación y cultivo*. Mundi–Prensa, Madrid. 224 p.
- Nikolaeva, M.G. 1977. Factors controlling the seed dormancy pattern in the physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. *Nort Holland, Amsterdam*. pp. 51-74.
- Ojeda M. 2005. Consideraciones sobre anonáceas. II Curso de Actualización de Conocimientos en Fruticultura. UCLA- Posgrado de Horticultura.
- Padilla, I.M.G. y C.L. Encina. 2003. *In vitro* germination of chirimoya (*Annona cherimola*) seeds. *Scientia Hort.* 97, 219-227.
- Popenoe, W. 1974. The Annonaceous fruits. In: W. Popenoe (Editor). *Manual of Tropical and Subtropical Fruits*. Hafner Press. New Yorkr:. pp. 16 1- 195.
- Pinto, A.C. 1975. Influencia do hormonio sobre o poder germinativo de sementes de graviola (*Annona muricata* L.) pp. 1-18. En: *Anais do III Congresso Brasileiro de Fruticultura*. Sociedade Brasileira de Fruticultura, Rio de Janeiro
- Pinto, A. y P. Genú. 1984. Contribuição ao estudo técnico científico da graviola (*Annona muricata* L.). pp. 529-546. En: *Congresso Brasileiro de Fruticultura*, 7, Florianópolis, Sociedade Brasileira de Fruticultura.
- Rajput, C. 1985. Custard apple. pp. 479-486. En: Bose, T. (ed.). *Fruits of India Tropical and Subtropical*. Department of Horticulture, India.
- Vargas, M. E. 1986. Efecto del acido giberlico y 6-bencill-amino-purina, sobre la germinación de semillas de chirimoyo (*Annona cherimoya* Mill.) cv. Bronceada. Tesis ingeniero Agrónomo. Universidad Catolica de Valparaiso, Facultad de Agronomía, Chile.
- Wunkshaus, R. 1990. Efecto de la temperatura, época de siembra y de la aplicación de los fungicidas Mancozeb y dicloran sobre la germinación de semillas de chirimoyo

(*Annona cherimoya* Mill.) Tesis ingeniero Agronomo. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía, Chile. 172.

1. Anatomía de semillas de *Annona squamosa* L. (Annonaceae)

La familia Annonaceae incluye aproximadamente 140 géneros. Tres géneros (*Annona*, *Rollinia* y *Asimina*) producen frutos comestibles (George y Nissen, 1987). Dos géneros son de importancia comercial; *Annona*, que comprende unas 100 especies, y *Rollinia*, que incluye cerca de 50 especies (George, 1985). Las principales especies comerciales son la chirimoya (*Annona cherimola* Mill.), el híbrido atemoya (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.), el anón (*Annona squamosa* L.) y la guanábana (*Annona muricata* L.).

En Colombia La familia *Annonaceae* está representada por 206 especies y 137 en su región Amazónica conocidas mundialmente por los frutos de guanábana, chirimoya y anón. Lotero (1976) en una revisión de la familia para el país registró 72 especies distribuidas en 17 géneros; Sánchez (1987) revisó 11 especies de *Guatteria* de la sección *Chasmanta* y recientemente Murillo y Restrepo (2000) revisaron 94 especies y 19 géneros que crecen en la región de Araracuara (Amazonía). En la mayoría de trabajos solo se hacen descripciones de especies nuevas para la ciencia o se presentan nuevos registros para la flora colombiana (Murillo, 2001).

La información referida a aspectos estructurales de la familia Annonaceae está limitada a algunas pocas especies y los estudios anatómicos referidos a frutos y semillas son muy escasos. Así mismo para análisis sistemático, los caracteres anatómicos de las semillas son menos utilizados que los caracteres florales debido a la menor utilidad filogenética y a la dificultad que representa trabajar estos órganos (Galastri, 2008). Sin embargo, Garwood (1995), señala que este tipo de estudios son relevantes para la comprensión de fenómenos ecológicos tales como la frugivoría, la sucesión ecológica, la dispersión y germinación de semillas, los cuales son de considerable importancia en procesos de restauración.

Según Svoma (1998) las descripciones anatómicas para el género Annonaceae se reportan desde Corner (1949), quien realizó un completo estudio anatómico de la semilla y sus integumentos en *Anaxagorea javanica*, *Annona squamosa*, *Desmos dasymaschala*, *D. chinensis* y *D. dumosa*, *Xylopiya fusca*, *X. caudata* y *X. malayana*, *Polyalthia purpurea*,

Artabotrys odorata, *Popowia*, *Alphonsea elliptica*, *Canaugium odoratum*, *Mezzettia leptopoda* y *Xylopia Curtisii*. El autor expone una serie de peculiaridades de las semillas del género las cuales se citan a continuación:

- El ovulo es anátropo o bien erguido con el micrópilo apuntando a la base del carpelo o transversal a la mayoría de semillas con carpelos.
- El integumento interno comúnmente sobrepasa al externo, lo que genera un prominente y expuesto endostoma.
- La calaza no está condensada, está es nombrada por el autor como pericálaza, carácter causado por el pronunciado y basipétalo desarrollo del óvulo y semilla en el extremo opuesto al micrópilo.
- La nucela se comienza a ruminar mediante pliegues de los integumentos en los lados de la semilla, las ruminaciones son en su mayoría transversales.
- El hilo está mal definido debido a que el exostoma está más o menos ausente entre el funículo y el endostoma: comúnmente el endostoma se ve como un diminuto micrópilo. Como resultado, el hilo está usualmente rodeado internamente por un plug de tejido leñoso que rodea el endostoma.
- La deficiencia en el hilo contribuye a la latencia de las semillas debido a la fácil desecación a través del tejido del hilo.
- La testa es fibrosa y consiste de fibras oblicuas y longitudinales

Posteriormente, Periasamy (1962), Swamy (1961) y Rao (1975, 1979, 1982) presentaron más en detalle aspectos anatómicos de algunas especies. Svoma (1998), en un estudio realizado en diferentes especies de anonáceas: *Ancana* sp., *A. stenopetala*, *Annona cherimola*, *A. montana*, *A. muricata*, *A. squamosa*, *Bocagea* sp., *Bocageopsis canescens* reporta que todas presentan el patrón anatómico característico de semillas de anonáceas: pericálaza, mesotesta fibrosa, y ruminaciones desarrolladas por ambos integumentos, sin embargo, algunas especies exhiben una capa endostestal ubicada en la región micropilar excepto en *Ancana*. Así mismo, arilo, sarcotesta delgada, que cuando es carnosa envuelve toda la semilla (Judd *et al.* 1999) y depresiones, están presentes en algunos taxa y muestran diferentes orígenes y estructura. Con relación a las Annonaceas Barroso *et al.* (1999), indican que el carácter ruminado de las semillas y sus embriones diminutos son caracteres de identificación de la familia.

Las semillas de la familia Annonaceae son sésiles, albuminosas, elipsoides, macizas y su longitud varía entre 5 y 30 mm. Poseen un endospermo ruminado (Corner, 1949; Garwood, 1995; Judd *et al.* 1999), sobre los que Van der Heijden y Bouman (1988), describieron cuatro tipos de ruminaciones: ruminaciones formadas por placas largas, placas estrechas, bastones o pequeñas placas entrelazadas por bastones achatados. El funículo es prácticamente sésil (Corner, 1949; 1976). Las semillas se forman a partir de un ovario anátropo, pericalazado bi o tritegumentado, crassinucelado, transverso o subbasal, erecto y por un micrópilo formado por el endostoma, condición dada porque el integumento interno excede el externo (Corner, 1949; 1976). En estados inmaduros la nucela llena enteramente la semilla.

Un aspecto encontrado en muchos géneros de Annonaceae es la ocurrencia de un tejido leñoso en la región micropilar que cierra la abertura de la testa, llamado plug micropilar (Van der Heijden y Bouman, 1988) o tejido subhilar (Corner, 1949). Este tejido resulta de la diferenciación y proliferación de la endotesta y puede presentar las forma de “T”, “Y”, “V” o cilíndrico, el cual es roto o apartado de la semilla en la germinación (Garwood, 1995).

Setten y Koek-Noorman (1992), indican que las semillas de Annonaceae al ser dispersadas presentan un embrión pequeño, considerado poco desarrollado e inmaduro, debido a esta inmadurez es necesario un tiempo para su crecimiento después de la dispersión. Por su parte Hayat (1963), reportó que las semillas de *Annona squamosa* L. presentan un embrión pequeño con dos cotiledones foliáceos delgados que demoran de uno a tres meses en germinar.

En el presente estudio se describen e ilustran las características anatómicas de semillas de *Annona squamosa* L., comparando los resultados con trabajos realizados en otras especies de la familia. Lo cual es importante no solo para efectos ecológicos y sistemáticos sino para aportar información útil en la comprensión de fenómenos asociados al proceso de germinación y latencia de estas semillas.

1.1 Metodología

Teniendo en cuenta que los tejidos seminales de *A. squamosa* L. son altamente resistentes al corte debido a la característica dura y leñosa de la testa, el protocolo de Sandoval (2005), para tejidos vegetales blandos empleado en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Agronomía, debió ser adaptado y modificado para obtener cortes en donde los tejidos estuviesen bien definidos y presentaran continuidad, por lo tanto la metodología presentada es el resultado de este proceso.

Semillas completas latentes de *Annona squamosa* L. con un 10% de humedad fueron imbibidas en agua destilada durante 72 horas. Posteriormente, las semillas fueron incluidas en una solución de ácido fénico al 50% durante 24 horas con el objetivo de ablandar las testas. Con ayuda de escalpelos números 11 y 23, fueron extraídos los embriones y posteriormente, se separaron órganos de interés como cotiledones, radícula y eje embrionario. Así mismo, se realizaron cortes de interés preliminares de los diferentes órganos con la ayuda de un escalpelo número 23. Se realizaron cortes ventrales, longitudinales y transversales de modo que se evidenciara la anatomía seminal en diferentes vistas y la asociación de los diferentes tejidos.

Los cortes fueron incluidos en casetes plásticos e inmersos en solución fijadora de Bouin (1897), durante 48 horas a temperatura ambiente para detener el deterioro de los tejidos. Este fijador en función de las características de la especie y el órgano incrementan la calidad de la fijación. Contiene ácido pícrico, formol, ácido acético y agua. Los casetes con los cortes fueron pasados por un gradiente de concentraciones de etanol al 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96 y nuevamente 96%, cada uno por un lapso de 24 horas. Posteriormente, los tejidos fueron inmersos por 24 horas en alcohol absoluto, seguidamente se imbibieron en Ter-butanol durante 24 horas.

Los cortes fueron imbibidos por 24 horas y a 60 °C en 4 concentraciones graduales de parafina fundida a 56 °C y Ter-butanol, incrementando cada vez la concentración de parafina y disminuyendo la concentración de Ter-butanol así: a). 25% de parafina – 75% Ter-butanol, b). 50% de parafina – 50% Ter-butanol, c). 75% de parafina – 25% Ter-butanol y d). 100% parafina. Se confeccionaron los bloques y se procedió a la realización de los cortes con el micrótopo, los bloques fueron sumergidos en una solución de ácido clorhídrico al 50% por tiempos de 1 a 4 horas. Luego de este tiempo, fueron lavados con abundante agua y puestos en cama de hielo con el objetivo de incrementar la solides de la parafina. Se realizaron cortes de 7 µm en el micrótopo. Con ayuda de un pincel, los cortes fueron puestos en baño de flotación a 50°C. Los cortes fueron capturados con ayuda de una lámina porta objetos previamente tratada con la albumina de Mayer (Johansen, 1940). Posteriormente, los cortes fueron desparafinados colocándolos en el horno a 60°C durante 24 horas. Seguidamente y para remover completamente la parafina de las láminas, se pasaron dos veces durante 10 minutos por xilol y posteriormente dos veces durante 10 minutos por etanol al 96%.

Una vez las láminas estuvieron listas, fueron lavadas con agua destilada e inmersas en safranina durante 24 horas. Cumplido el período de tiempo, fueron lavadas durante 5 minutos con abundante agua destilada hasta la remoción de la safranina sobrante. Las láminas fueron puestas en alcohol pícrico al 85%, durante 20 segundos, seguidamente se realizó un lavado con agua destilada por 5 minutos, inmediatamente se pasaron a alcohol amoniacal por 2 minutos y nuevamente se realizó un lavado con agua destilada. Luego de esto, las láminas fueron puestas en etanol al 96% por 5 minutos y a continuación en Fast Green durante 10 segundos. Posterior, las láminas se incluyeron en esencia de clavo por 2 minutos y nuevamente a etanol al 96% dos veces cada vez durante 5 minutos. Con el objetivo de eliminar rastros o excesos de colorante, las láminas se pasaron por isopropanol por 5 minutos y finalmente se sumergieron en xilol dos veces cada una durante 10 minutos.

Finalizado el proceso de tinción, las láminas se limpiaron y se aplicó historesina sobre los cortes sellando con una lámina cubre objetos. Las documentaciones y observaciones fueron hechas con microscopio marca Olympus CX31 y la edición de imágenes con el software Image – Pro Plus®.

1.2 Resultados y discusión

Cubierta seminal

La cubierta seminal está compuesta de diferentes secciones visibles correspondientes al integumento externo compuesto por exotesta, mesotesta y endotesta, conformado por fibras transversales, longitudinales y oblicuas, y por el integumento interno ó tegmen (Figura 1-1 A). La epidermis más externa referida como exotesta, es uniseriada, conformada por células isoradiométricas tangencialmente alargadas, cuboides, con paredes delgadas y espesamiento en la pared periclinal externa y adicionalmente células alargadas anticlinalmente como una palizada. Se observa hipodermis compuesta de una o dos capas de células isoradiométricas de pared delgada, comprimidas y de aspecto cristalino (Figuras 1-1 E y 1-1 F).

La mesotesta en dos capas presenta fibras lignificadas longitudinales alargadas interrumpidas por células oblicuas y transversales altamente empaquetadas, que pueden corresponder a macroesclereidas subsecuentes a braquiesclereidas cubiertas con una delgada cutícula, así como una a tres capas de células hipodérmicas (Figuras 1-1 A, 1-2 A y 1-1 F). La endotesta está compuesta de fibras transversales isoradiométricas de paredes espesadas en multicapas aunque menos empaquetadas que en la mesotesta. Esta compone tanto las ruminaciones y su proliferación se extiende hacia la zona micropilar en donde da lugar al plug micropilar el cual es de apariencia multiseriada (Figura 1-1 A, 1-1 B y 1-1 C). Inmerso en el integumento externo se observó un fragmento de pericálaza en el plano longitudinal mediano de la endotesta, en donde fue posible identificar más de dos filas de tejido vascular (Figura 1-1 D) y células parenquimatosas de paredes delgadas con pequeños espacios intercelulares.

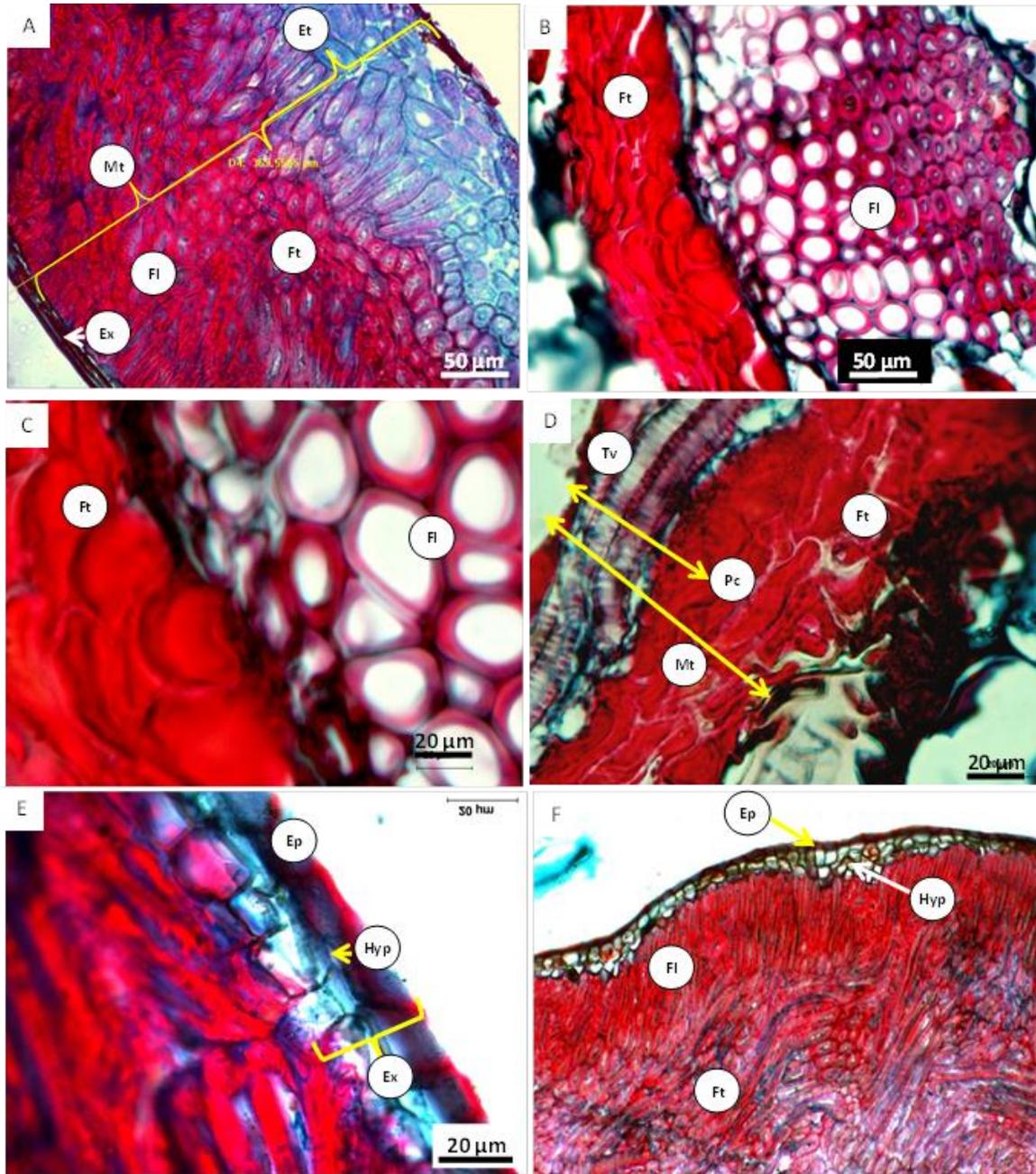


Figura 1-1. Cubierta seminal de *A. squamosa* L. sección longitudinal (A) y transversal (B) de la cubierta seminal. (C) detalle de fibras de la cubierta seminal. (D) sección longitudinal de pericalaza y endotesta. (E) detalle de hipodermis y epidermis. (F) sección longitudinal de mesotesta, hipodermis y epidermis. Ex exotesta; Mt mesotesta; Et endotesta; Hyp hipodermis; Ep epidermis; Ft fibras transversales; Ft fibras longitudinales; Ei epidermis interna. Pc pericalaza; Tv tejido vascular.

Se observaron pliegues de los integumentos internos y externos (tegmen y endotesta) compuestos principalmente por fibras transversales (Figura 1-2), los cuales penetran en el endospermo para dar lugar a las ruminaciones, las cuales se distribuyen a lo largo de la longitud de la semilla. En la figura 1-2 D y 1-2 F se aprecia en detalle la estructura

celular de los pliegues los cuales se constituyen por la endotesta y el tegmen en asociación con el endospermo. Así mismo se observan regiones de la mesotesta con secciones de hipodermis y el menor empaquetamiento de las fibras de la endotesta cuando está incluida en el endospermo (Figura 1-2 E).

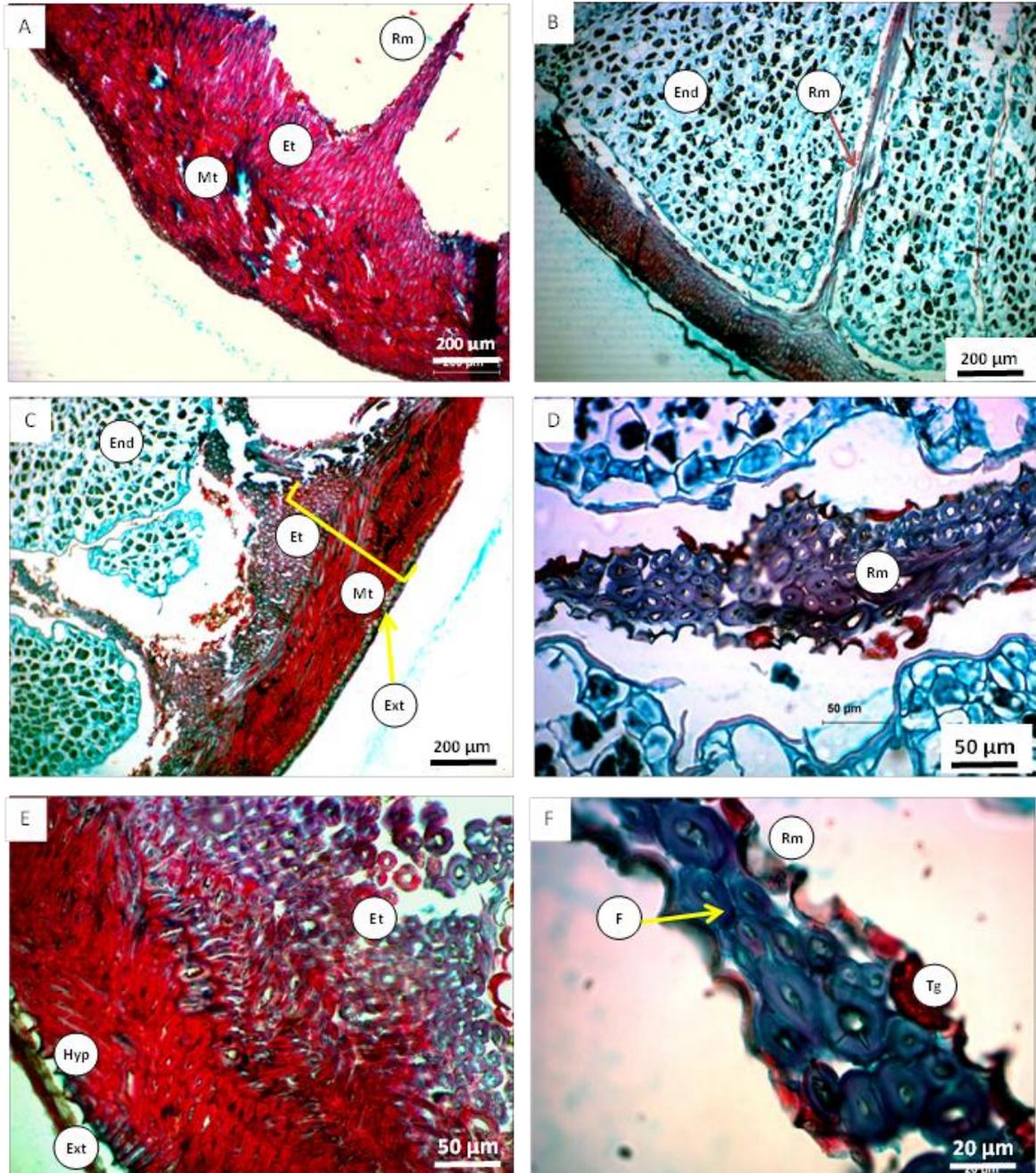


Figura 1-2. Tipos y parte del fruto de Sección longitudinal de endotesta y ruminaciones de *A. squamosa* L. (A) Sección transversal del pliegue del integumento externo en donde se observa la endotesta. (B) inclusión de los integumentos externo e interno (ruminación) en el endospermo. (C)

Celulas de endotesta formando las ruminaciones transversales. (D) ruminación. (E) detalle de las células de la endotesta (braquiesclereidas). (F) Detalle de los integumentos externo e interno formando una ruminación. Rm ruminación, Et endotesta, Mt mesotesta, Ext exotesta F fibras, Ft fibras transversales, End endospermo, Hyp hipodermis, Tg tegmen.seminal de *A. squamosa* L. sección longitudinal (A) y transversal (B) de la cubierta seminal. (C) detalle de fibras.

Se observa en las figuras figura 1-3 A, 1-3 B y 1-3 C un integumento interno compuesto de un tegmen de una sola capa, de apariencia colapsada, dispuesto después de la endotesta y rodea las ruminaciones del endospermo.

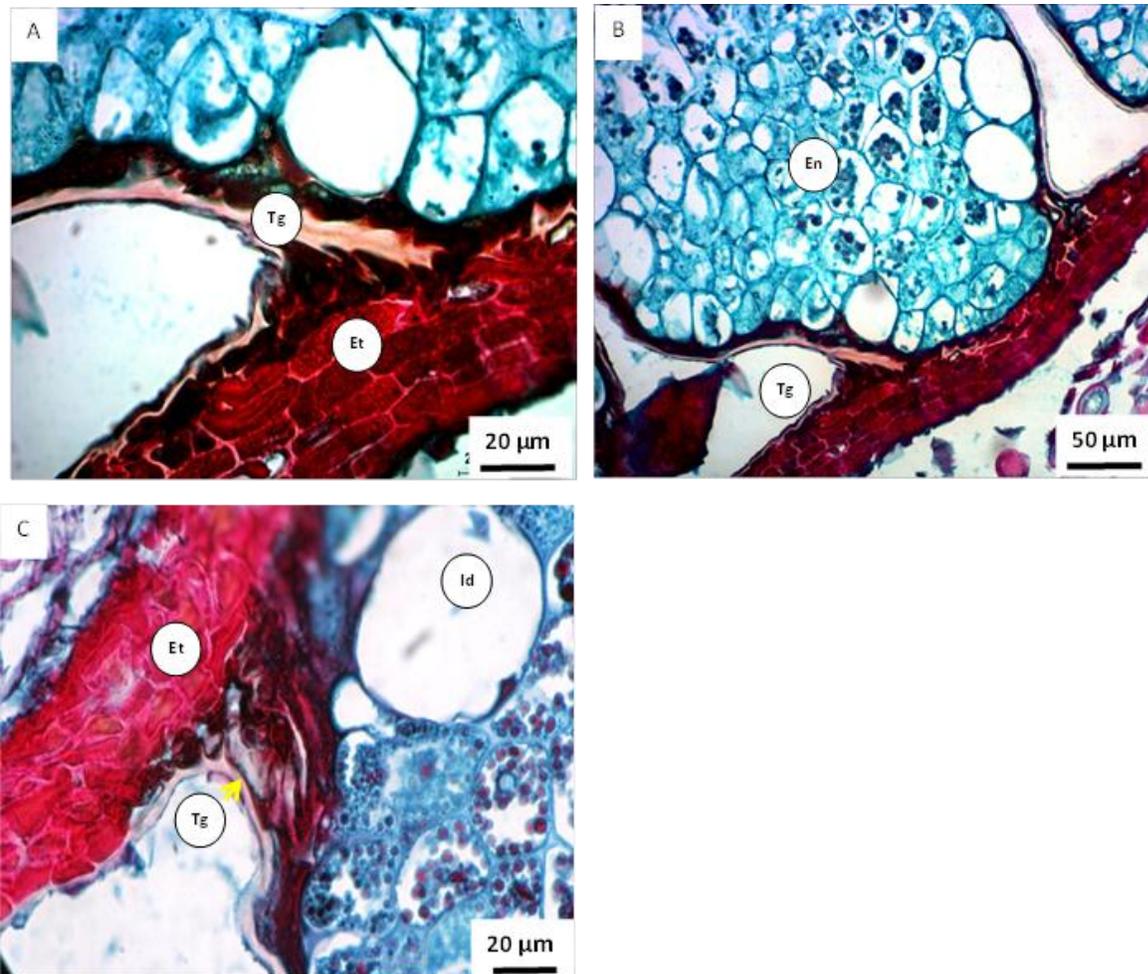


Figura 1-3. Sección longitudinal del integumento interno y endospermo ruminado de *A. squamosa* L. (A) y (B) detalle del tegmen colapsado y células del endospermo. (C) vista longitudinal del endotegmen y exotegmen. Se observa idioblasto oleífero. *Tg* tegmen, *Et* endotesta, *En* endospermo, *Id* idioblasto.

El plug micropilar es de forma cónica, formado por células fibras transversales isoradiométricas de la endotesta, algunas contienen cristales. Se evidencia el menor apiñamiento de fibras (braquiesclereidas y macroescleridas) y formación de tejido poco denso (aerénquima). Se observa también restos de integumento interno, principalmente tegmen formando la capa nucelar. En el plug micropilar es posible identificar una región

lineal en donde las células se disponen de forma menos densa, la cual podría constituir una línea de fractura (Figura 1-4). Adicionalmente se observó que la consistencia del tejido micropilar es suave y viscosa.

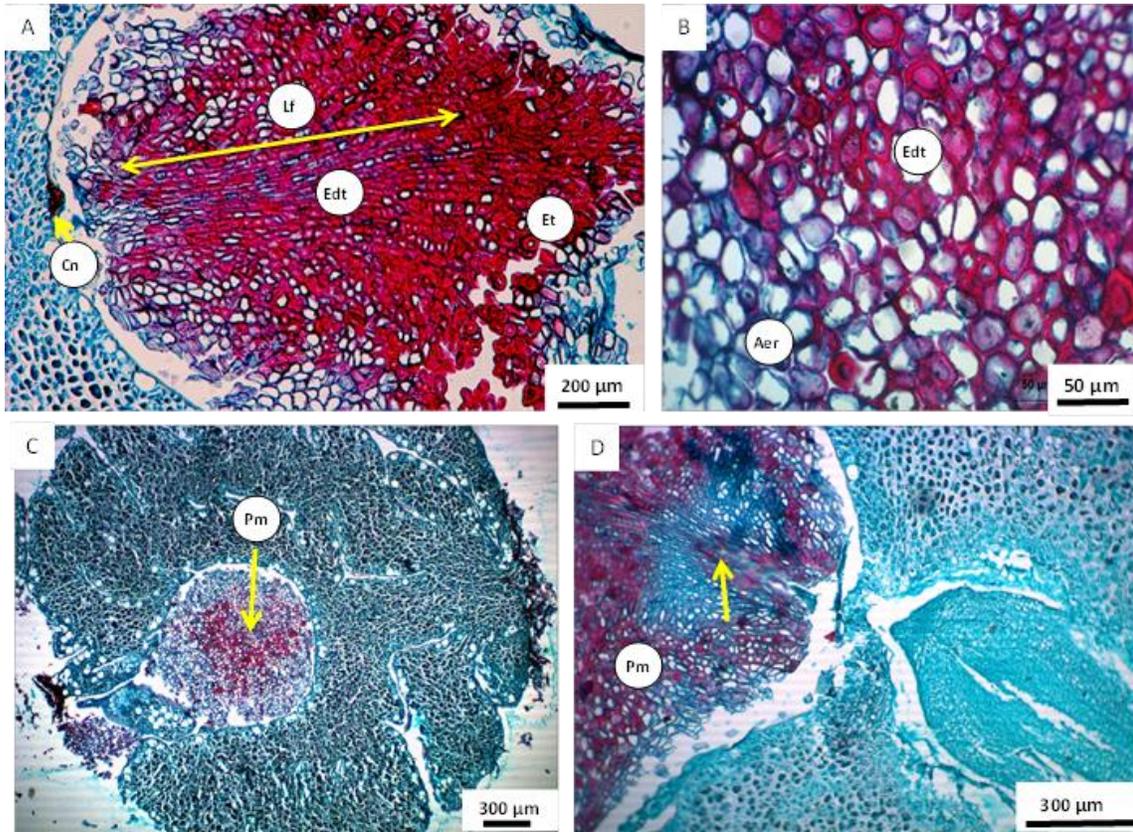


Figura 1-4. Región micropilar de *A. squamosa* L. (A) sección longitudinal del plug micropilar, se observa línea de fractura (línea amarilla), endostoma y capa nucelar. (B) detalle de células del plug micropilar y células aerenquimáticas. (C) sección transversal del plug micropilar. (D) plug micropilar en forma de cono, se observa formación de fractura al momento de la germinación. Cn capa nucelar, Edt endostoma, Et endotesta, Lf línea de fractura, Aer aerenquima, Pm plug micropilar.

Corner (1949) reportó en *A. squamosa* L. características de la exotesta muy similares a las encontradas en este estudio. Según el autor, la exotesta consiste de una epidermis de células incoloras isoradiométricas, con paredes externas mucho más densas. Así mismo en otras especies de Annonaceae, persisten características anatómicas similares a la exotesta de *A. squamosa* L. Por ejemplo, en *Annona dioica* la exotesta es también uniseriada, presenta células más o menos cuboides de paredes delgadas, impregnadas de sustancias fenólicas. En *Duguetia furfurácea* y *Xylopiá emarginata* (Annonaceae) la exotesta está compuesta por células fenólicas de aspecto palizado de paredes pécticas delgadas con reserva amilífera y sin tejido nucelar evidente (Galastri, 2008). Svoma (1997) indica que en *Bocageopsis canescens* (Annonaceae) la exotesta consiste de

células isoradiométricas a anticlinales muy estrechas y de pared delgada, que contienen generalmente una gran vacuola la cual está rodeada por pequeños granos taníferos, adicionalmente, hay células solitarias alargadas. Rasgos similares también están presentes en *Ancana* sp., *A. stenopetala*, *A. cherimola*, *A. montana*, *A. muricata*, *Bocagea* sp., *Bocageopsis canescens*, *Unonopsis*, *Xylopiya aromatica* y *X. emarginata*. En *Annona muricata* y *A. reticulata* la exotesta está constituida por esclereidas impregnadas de taninos (Corner, 1949; 1976, Van der Heijden y Bouman, 1988; Svoma, 1997; 1998).

Los rasgos de la hipodermis observados en el presente estudio también son consistentes con lo reportado por Corner (1949); Van der Heijden y Bouman (1988) y Svoma (1998) para *A. squamosa* L. quienes indican que este tejido está compuesto de una fila de pequeñas células de pared delgada, comprimidas e incoloras que contienen una materia cristalina, lo cual es común en el género Anonaceae. En especies como *Annona*, *Raimondia*, *Rollinia*, *D. furfuracea* y *X. emarginata*, Van der Heijden y Bouman (1988) y Galastri (2008), encontraron características anatómicas de la hipodermis similares a las encontradas para *A. squamosa* L., sin embargo en *Annona dioica* este tejido difiere debido a que está formado por células voluminosas de paredes delgadas y contenido péctico que se distribuyen en toda la longitud de la semilla (Van der Heijden y Bouman, 1988).

Las características de la mesotesta de *A. squamosa* L. coinciden con lo reportado para Anonaceae por Corner (1949); Van der Heijden y Bouman (1988) y Svoma (1998). En donde se reportan dos regiones distintas, una externa compuesta de fibras longitudinales y una interna por fibras transversales. Las fibras presentan paredes espesadas y lignificadas (Svoma, 1997; 1998).

En el presente estudio fue posible la identificación de dos regiones en la mesotesta, sin embargo este rasgo difiere en *Annona hypoglauca*, la cual presenta una mesotesta compuesta por tres regiones mientras que en *Annonan tenuiflora* y *Polyalthia purpurea* no existe diferenciación de regiones (Van der Heijden y Bouman, 1988; Corner, 1949). La presencia en la mesotesta de fibras longitudinales ininterrumpidas por áreas de fibras transversales se reporta en otras especies de Annonaceae como en *Annona muricata*, *Annona bicolor*, *A. senegalensis*, *A. sericea*, *Raimondia quinduensi*. En estas las fibras de la mesotesta pueden atravesar la sección externa (Van der Heijden y Bouman, 1988).

A diferencia de lo encontrado para *Annona bicolor*, *A. cherimola*, *Rollinia mucosa* y *R. emarginata* por Van der Heijden y Bouman (1988) no se evidenciaron células parenquimáticas o células no lignificadas la mesotesta de *A. squamosa* L., pues el tejido es de apariencia fibrosa y lignificado, lo cual también fue reportado en *Ancana* sp., *A. stenopetala*, *Annona cherimola*, *A. montana*, *A. muricata*, *Bocagea* sp., *Bocageopsis canescens*, *Unonopsis* por Svoma, (1997, 1998) *Xylopiya aromatica* y *X. emarginata* y por Galastri (2008) en *D. furfuracea* y *X. emarginata*.

Las características de la endotesta concuerdan con las reportadas por Svoma (1997) y Van der Heijden y Bouman (1988) para *Annona squamosa* L. Por su parte Corner, (1949) reporta que este tejido está constituido por células arregladas compactamente, lo cual es similar a lo encontrado en *Asimina triloba* por Rao (1982). En nuestro estudio encontramos que es este un tejido fibroso que participa en la formación de las ruminaciones y del plug micropilar y que es observado también en las regiones laterales de la semilla en el tejido pericalazal, lo cual coincide perfectamente con lo reportado por Corner (1949), quien fruto de observaciones en *Canangium odoratum* definió la endotesta con el termino integumento intermediario, haciendo referencia al integumento que se ubica entre los integumentos externo e interno.

A diferencia de lo encontrado en *Artabotrys hexapetalus* por Svoma (1998), en la endotesta de *A. squamosa* L. no fue posible observar células preinchadas por granos de almidón e idioblastos clistalíferos. Estos idioblastos se presentan como cristales solitarios de oxalato de calcio y en su mayoría son prismáticos (Svoma, 1998).

La cálaza en las Annonaceae se extiende alrededor de la semilla, frente a esto Corner (1949; 1976), define el término pericálaza para describir la condición en la que la calaza y el paquete vascular se extiende alrededor de la semilla. Según Boesewinkel y Bouman (1984) hasta el plano longitudinal mediano, desde el funículo hasta el micrópilo.

Las observaciones sobre la anatomía de la pericalaza en este estudio están acorde a las realizadas por Corner (1949, 1976), Mohana Rao (1979, 1982), Van der Heijden y Bouman (1988) y Svoma (1997, 1998) en diferentes especies de Annonaceae. Los autores señalan que la pericálaza está constituida por células parenquimáticas que incluye el sistema vascular. Este tejido se desarrolla a lo largo de la semilla en el plano longitudinal mediano y presenta un tejido tanífero en la región en donde la mesotesta es interrumpida por los haces vasculares de la pericálaza. Sin embargo en el presente estudio no fue posible identificar la continuidad de la pericalaza en el perímetro de la semilla, ni células taníferas, sin embargo se observó que la pericalaza interrumpe el plano mediano de la endotesta.

De acuerdo al tipo de *Annona* los pliegues de las ruminaciones se desarrollan en las partes laterales de la semilla por acción de los dos integumentos (Periasamy, 1962). En el presente trabajo, las ruminaciones de las semillas de *A. squamosa* L. son generadas a partir de la endotesta y el tegmen, similar a lo repostado por Corner (1949) y Galastri, (2008), quienes señalan que las ruminaciones del endospermo son generadas por pliegues transversales no vascularizadas de tegmen, testa o del tegumento intermediario y que están interrumpidas en el plano medio por la pericálaza (Rao, 1975; Svoma 1998). Sin embargo en algunas Annonaceae las ruminaciones están formadas por la testa, pues el tegmen está colapsado (Rao, 1975; 1979; 1982; Svoma, 1998). En *D. furfuracea* e *X. emarginata*, las ruminaciones están formadas por la mesotesta interna, la endotesta y en

tegmen. En *A. dioica*, la región mediana de la mesotesta también forma parte de las ruminaciones (Galastri, 2008). Corner (1949), señala que el proceso de formación de las ruminaciones inicia en estados tempranos de desarrollo en donde el tejido nucelar es interrumpido por inclusiones paralelas y laterales de los integumentos externo (endotesta) e interno (tegmen).

Las características del tegmen observadas en semillas de *A. squamosa* L. son similares a las reportadas por Corner (1949). El autor indica que el tegmen no es multiplicativo y en general está colapsado, teniendo o no células de oleo. Similar a lo hallado para *Annona cherimola* (Schroeder, 1951) el tegmen de las semillas de *A. squamosa* L. según los resultados del presente estudio, está constituido por una única capa de fibras (Figura 3-1), mientras que en *Anaxagorea javanica*, está formado por cuatro capas de células de paredes delgadas, algunas con contenido lipídico (Corner, 1949). En *Artabotrys hexapetalus*, tiene dos capas de células durante todo su desarrollo (Svoma, 1997), mientras que, en *Xylopia aromatica* y *Bocageopsis canescens*, el tegmen colapsa excepto en la región micropilár (Svoma, 1998). En *Annona glabra*, especie cuya dispersión seminal es hidrocórica el tegmen parenquimático funciona como un tejido de fluctuación (Van der Heijden y Bouman, 1988).

Setten y Koek-Noorman, (1992) señalan que en anonáceas el integumento interno ó tegmen es normalmente es más desarrollado en la región entre el rafe y antirafe y se observa espesado en la región circundante al micrópilo. Van der Heijden y Bouman (1988), mostraron que el tegmen normalmente presenta células de paredes delgadas aunque en *Rollinia silvatica*, *R. mucosa*, *R. annonoides* y *R. emarginata*, ocurre un espesamiento de las paredes.

Un hallazgo anatómico importante en el presente estudio, fue la identificación del tejido que conforma el plug micropilar, el cual tiene características similares al del integumento intermediario o endotesta. Este es lignificado, pero menos empaquetado de que el tejido mesotestal, lo que indica que el plug micropilar es resultado de la diferenciación y proliferación de la endotesta. Esto concuerda con los reportes de Galastri (2008) en *D. furfuracea* e *X. emarginata* y Svoma (1998) en *Annona squamosa*, *Xylopia aromatica* y *X. emarginat*. En donde se revela que el plug micropilar está conformado por la endotesta. En contradicción, Corner (1949; 1976) indicó que el plug micropilar leñoso de las semillas de anonáceas se deriva del integumento interno o posiblemente de integumento intermedio cuando está presente. En *Ancana* el plug micropilar está compuesto enteramente del tegmen.

Las características de las fibras presentes, braqui y macroesclereidas son similares a las encontradas en el plug micropilar de guanábana por Esau (1959), en donde el autor reporta que el micrópilo de la semilla presenta en un tapón piramidal formado por células esclerenquimáticas, tipo braquisclereidas. Por su parte Van der Heijden y Bouman (1988), indicaron que el plug micropilar se origina del exostoma y está formado por células esclerenquimáticas, isodiamétricas, algunas con cristales.

La forma de cono del plug micropilar encontrada en el presente estudio anatómico de semillas de *A. squamosa* L. también fue reportado por Svoma (1997; 1998) el cual adicionalmente indica que el plug no es expelido de la semilla en la germinación sino que se quiebra a lo largo de una línea de fractura que se forma antes de la germinación. La región de fractura visible en los cortes de plug micropilar en el presente estudio y también fue reportada en en semillas de *D. furfurácea* y *X. emarginata* por Galastri (2008).

La consistencia del plug micropilar es otra característica relevante en *A. squamosa* L. su aspecto y textura también fue reportada por Svoma (1998), quien señala que en *Annona cherimola*, *A. montana*, *A. muricata* e *A. squamosa*, hay presente una masa parenquimática pegajosa que forma una especie de cierre parcial en la apertura de la testa. En *Artabotrys hexapetalus* también ocurre la formación de cierre que recubre la endotesta múltiple. Dicho cierre está formado por una masa de células taníferas sin paredes lignificadas (Svoma 1997).

Endospermo

El endospermo es celular y ruminado, ocupa la mayor parte de la semilla y es el principal tejido de reserva. Presenta células voluminosas de diferentes tamaños pero generalmente isoradiométricas, meristemáticas, con citoplasma denso, las cuales se dividen en sentido anticlinal (Figura 1-5 A). De paredes ligeramente engrosadas las células presentan estructuras de reserva no identificadas, presumiblemente contenidos lipídicos (oleosomas) y pécticos (Figuras 1-5 E y 1-5 F) (Corner 1949; 1976; Svoma 1997). En la región micropilar se observan células de menor tamaño y densidad, así mismo se observan no más de 8 capas de células endospermáticas, separando el embrión del plug micropilar.

Las ruminaciones son separadas unas de otras por inclusiones o pliegues transversales de los tegumentos externo e interno. Son espiniformes más o menos achatadas y fimbriadas (Figuras 1-5 B y 1-5 C). Se observan idioblastos presumiblemente oleíferos (Figuras 1-5 C y 1-5 D) en los extremos de las ruminaciones, cerca al borde de la semilla, en donde también se observan células dispuestas de forma irregular y de forma y tamaño diferente a las células voluminosas presentes en la mayoría del tejido endospermático. Estas pueden corresponder a restos de nucela.

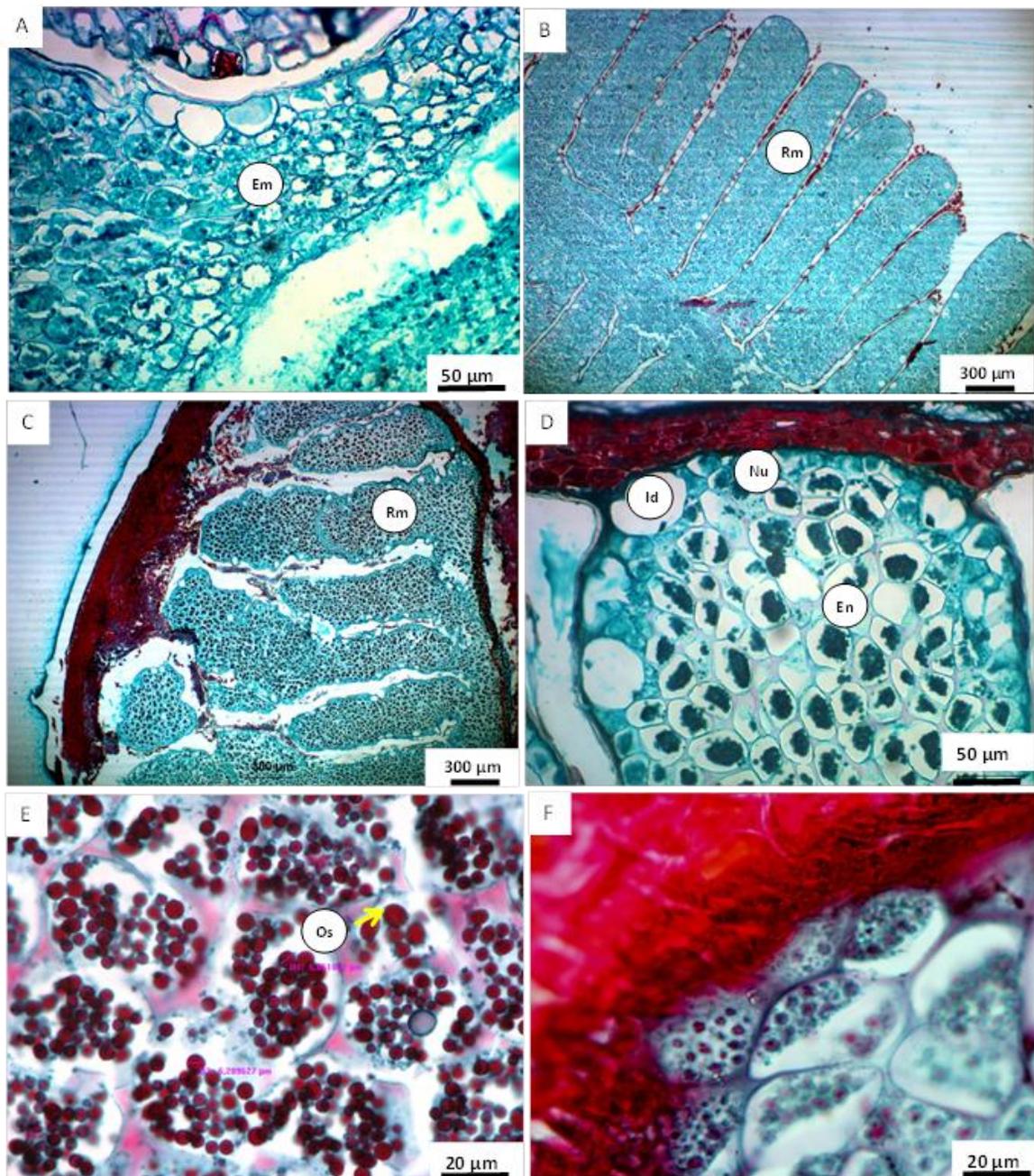


Figura 1-5. Endospermo de *A. squamosa* L. (A) detalle del endospermo micropilar, se observan idioblastos. (B) y (C) Sección longitudinal del endospermo, forma y dirección de las ruminaciones. (D) endospermo ruminado. Se observan idioblastos oleíferos y restos de nucela. (E) y detalle de células endospermáticas. Se observan oleosomas de diferentes tamaños. (F) células endospermáticas en región cerca de la endotesta. *Em* endospermo micropilar, *Rm* ruminaciones, *Id* idioblastos, *Nu* nucela, *Os* oleosoma.

El endospermo de *A. squamosa* L. corresponde a las características mencionadas por otras Annonaceae (Galastri, 2008; Corner, 1949, 1976; Schroeder, 1951; Svoma, 1997). El endospermo ruminado es típico de las Annonaceae según Boesewinkel y Boumann,

(1984) y se caracteriza por no tener vascularización y porque circunda perfectamente el diminuto embrión, simulando un sistema biológico de irrigación (Vilamil *et al.*, 1999). En guanábana, según Vilamil *et al.* (1999), la semilla presenta un endospermo albuminoso, abundante, masivo y parenquimatoso, con paredes celulares poco gruesas y su consistencia es de tipo corneo.

Pese a que no se estudió el tipo de sustancias de reserva en las células endospermáticas de las semillas de *A. squamosa* L., algunos autores (Galastri, 2008; Corner, 1949, 1976; Schroeder, 1951; Svoma, 1997) reportan dos tipos de sustancias de reserva en Annonaceae; lipídica y amilífera. Sin embargo predominan los reportes en donde los lípidos son las principales sustancias de reserva, aunque también proteínas y amidas. En *A. dioica* el endospermo está constituido principalmente por proteínas, amidas y lípidos y en *D. furfuracea* y *X. emarginata* principalmente de lípidos. Así mismo, en la región media del endospermo estas especies presentan células de paredes más delgadas con contenidos pépticos (Galastri, 2008). En algunas especies *Polyalthia longifolia* (Rao 1979), *Xylopiya emarginata* (Svoma 1998), *Xylopiya malayana*, *Polyalthia purpurea* y *Popowia nervosa*, el endospermo es rico en aceites y en almidón (Corner 1949). *Anonidium mannii* posee un endospermo con una gran reserva de amidas y pequeñas cantidades de lípidos (Van der Heijden y Bouman, 1988). *Bocageopsis canescens* (Svoma 1998), *Xylopiya fusca* y *Alphonsea elliptica*, tienen endospermos con paredes espesadas que acumulan sustancias lipídicas y en particular se observan paredes con cristales (Corner, 1949). *Unonopsis* también presenta células con paredes espesadas pero acumulan más lípidos y una pequeña cantidad de amidas y pequeños cristales (Galastri 2008). En *A. muricata* Vilamil *et al.*, (1999) encontraron que el endospermo está compuesto por amilodextrina, especialmente en las células periféricas de las ruminaciones, además de amiloides, lípidos, cristales de calcio y proteínas. Por su parte Kooiman (1967), encontró un xiloglucano compuesto por galactosa, xilosa y glucosa, formando la parte principal de las paredes celulares y, además de galactomananas, sin presencia de material amiláceo y lípidos.

El tipo de ruminación fimbriado presente en *A. squamosa* L. esta dentro de los tipos reportados por Setten y Koek-Noorman (1992), quienes indica que las ruminaciones pueden ser lameladas, fimbriadas, recortadas o en bastones y no se forman regiones de rafe y antirafe (*Ipsis verbis*). El hilo raramente está definido (Corner, 1949) ó es basal pudiendo estar expuesto u oculto por el arilo rudimentario (Garwood, 1995).

Los restos de tejido nucelar y los idioblastos encontrados en la región terminal de las ruminaciones con presumible contenido lipídico, también fueron reportados por Corner (1949) para *Annona squamosa* L. El autor indica que el endospermo posee células nucleares que contienen tres a cuatro gotas de aceite incorporadas en la región más externa del endospermo, lo cual es un rasgo que se genera debido a que en el proceso de maduración seminal, el endospermo sustituye la totalidad de la nucela excepto las

células de aceite (idioblastos) (Corner, 1949; Van der Heijden y Bouman, 1988). En algunas especies de Anonaceae también es posible identificar cutícula, epidermis nucelar e idioblastos oleíferos subepidérmicos (Van der Heijden y Bouman, 1988).

En cuanto al origen y formación de las ruminaciones Werker (1997) argumenta que las ruminaciones se dan debido al desarrollo de los integumentos en cierto estado del desarrollo seminal en donde el endospermo se torna quiescente. Cuando la semilla ha alcanzado su tamaño final el endospermo se activa y se ajusta internamente a las ruminaciones previa absorción de la nucela. Por su parte Corner (1949), indica que el proceso de formación de las ruminaciones inicia en estados tempranos de desarrollo en donde el tejido nucelar es interrumpido por inclusiones paralelas y laterales de los integumentos externo (endotesta) e interno (tegmen). En el proceso de maduración de la semilla el endospermo se expande en la nucela dentro de las ruminaciones. En semillas inmaduras las ruminaciones están formadas por la nucela y posteriormente, cuando el endospermo alcanza su tamaño final, las ruminaciones se forman de endospermo (Corner, 1949).

Svoma (1997) argumentó que las ruminaciones sirven para el suministro de nutrientes y suministro de agua para el endospermo y el embrión. Sin embargo, hay dudas al respecto, debido a que el suministro de nutrientes y agua durante el desarrollo de la semilla y en estados tempranos de la germinación se hace solo a través de la pericálaza. Por su parte Bayer y Appel (1996) argumentaron que las ruminaciones, al estar frecuentemente constituidas por aceites y sustancias fenólicas, hacen a las semillas menos atractivas a los predadores. Así mismo, el aumento del área de contacto entre los integumentos y el endospermo facilita el suministro de agua, oxígeno y nutrientes necesarios para el endospermo o el desarrollo embrionario. Por otra parte, las ruminaciones son más permeables a gases que el endospermo facilitando así el intercambio gaseoso (Svoma, 1997).

Embrión

El embrión se encuentra en la parte basal central hacia la zona hilar, protegido por el plug micropilar, lo cual concuerda con los resultados de Villamil (1999). Con un tamaño alrededor de 3,6 mm, es lineal, recto, con dos cotiledones planos, delgados y foliáceolanceolados, y se encuentra embebido en el endospermo (Figura 1-6). Es diminuto y recto, con eje embrionario poco diferenciado y plúmula rudimentaria (Figura 1-6 A, 1-6 B y 1-6 C). Presenta células meristemáticas, isoradiométricas, de paredes delgadas, tanto en hipocótilo, cotiledones como en la radícula. Es fácil observar el procambium y el meristemo apical de (Figura 1-6 D). La consistencia del embrión es carnosa y se desprende fácilmente del endospermo hidratado; sus células son circulares, sin una distribución uniforme.

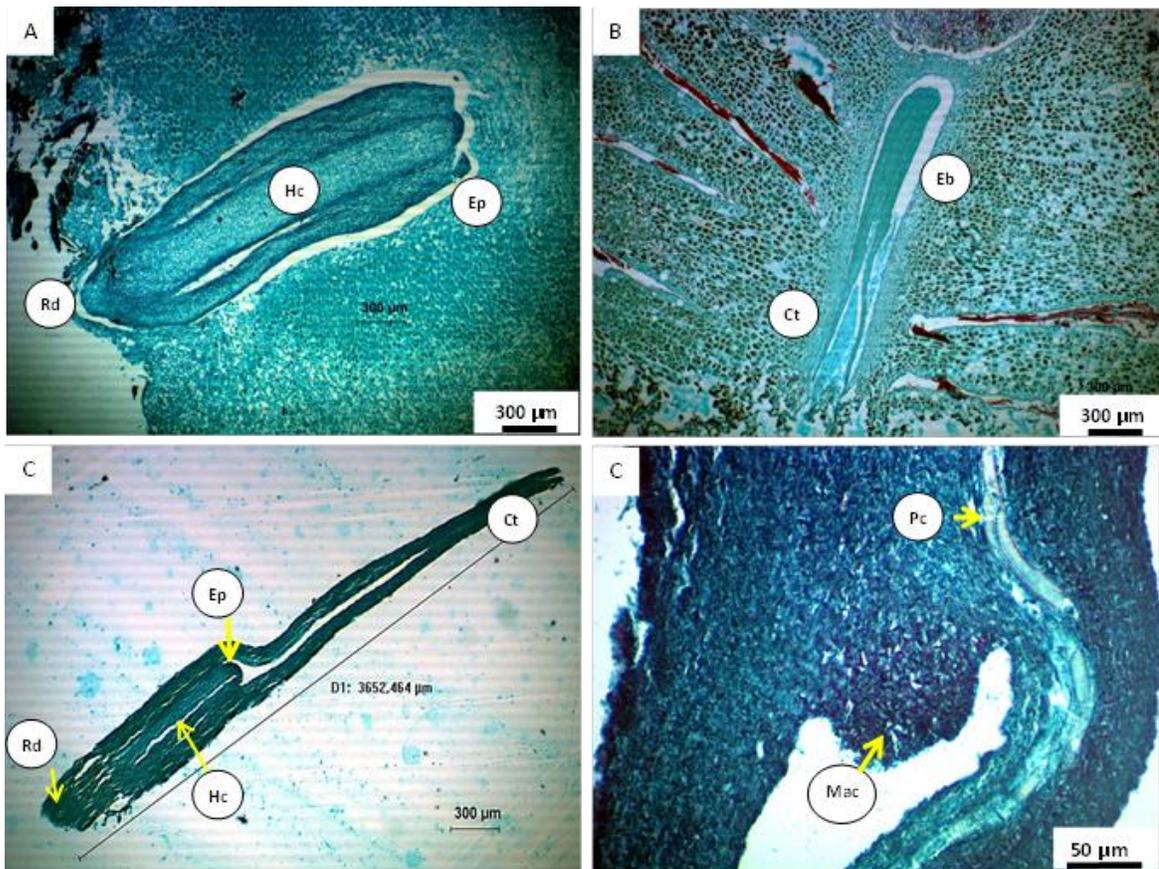


Figura 1-6. Embrión de semillas de *A. squamosa* L. (A) endospermo imbibido en donde se aprecian hipocotilo, radícula e hipocotilo. (B) embrión asociado a endospermo, se aprecian cotiledones. (C) estructuras embrionarias, se observa hipocotilo, radícula, epicotilo y cotiledones. (D) meristemo apical caulinar y procambium en embrión. Rd radícula, Hc hipocotilo, Ep epicotilo, Ct cotiledones, Pc procambium, Mac meristemo apical caulinar.

Las características del embrión concuerdan con las reportadas para *Annona squamosa* L. por Hayat (1963); Hayat y Canright (1965) y para la familia Annonaceae por diferentes autores (Corner, 1949; Hayat, 1963; Hayat y Canright, 1965; Garwood, 1995; Svoma, 1997, 1998; Judd *et al.*, 1999) y por Galastri (2008) en *D. furfuracea*, *A. dioica* y *X. emarginata*. Hayat y Canright (1965) también reportan para *Annona squamosa* L. la presencia de epidermis y procambium diferenciados en el embrión. Hayat (1963) observó que los cotiledones están separados por una capa delgada de levulosa. En *A. muricata* Según Villamil (1999), las paredes celulares, están formadas por amiloides y altos contenidos de lípidos.

Las semillas de Annonaceae presentan un embrión pequeño considerado poco desarrollado o inmaduro. Debido a esta inmadurez es necesario un tiempo para su crecimiento después de la dispersión (Setten y Koek-Noorman, 1992).

2. Cambios morfoanatómicos y en el contenido de carbohidratos, proteínas y actividad peroxidasa durante la germinación de semillas de anón (*Annona squamosa* L.) (Annonaceae)

El Anón, *Annona squamosa* L., es la especie del género *Annona* más ampliamente distribuida en el mundo, en Colombia se encuentra en las zonas secas de los valles interandinos en los departamentos de Valle, Caldas, Tolima, Cundinamarca y los Santanderes (Guerrero y Fischer, 2007). El anón crece desde el nivel del mar hasta los 1000 msnm (Hoyos, 1989), no requiere de períodos fríos por lo que se desarrolla y crece bien en condiciones relativamente estables de temperatura (George y Nissen, 1987). La temperatura mínima se encuentra en un rango de 10 a 20°C y la máxima de 22 a 28°C (Guerrero y Fischer, 2007).

Las semillas de la familia Annonaceae son sésiles, albuminosas, elipsoides, macizas y su longitud varía entre 5 a 30 mm. Poseen un endospermo ruminado (Corner 1949, Garwood 1995, Judd *et al.* 1999). El embrión es pequeño, recto, con eje embrionario moderadamente desarrollado, plúmula rudimentaria y cotiledones planos y delgados los cuales se desarrollan después que la semilla está formada (Corner, 1949; Garwood, 1995; Judd *et al.*, 1999). Setten y Koek-Noorman (1992), indican que las semillas de Annonaceae al ser dispersadas presentan un embrión pequeño, considerado poco desarrollado e inmaduro; debido a esta inmadurez es necesario un tiempo para su crecimiento después de la dispersión. Por su parte, Hayat (1963), reportó que las semillas de *Annona squamosa* L. presentan un embrión pequeño con dos cotiledones foliáceos delgados que demoran de uno a tres meses en germinar.

La germinación puede ser definida como la emergencia y desarrollo, a partir del embrión, de todas aquellas estructuras esenciales que son indicativas de la habilidad de la semilla para producir una plántula normal bajo condiciones favorables (AOSA, 2000). Según Bewley (1997) y Finch-Savage y Leubner-Metzger (2006), la germinación de las semillas es un proceso fisiológico complejo provocado por la imbibición de agua después de que los posibles mecanismos de latencia han sido superados. Bajo condiciones favorables, el rápido crecimiento del embrión rompe las capas de recubrimiento y se presenta la protrusión de la radícula. Esta emergencia de la radícula se considera como la finalización de la germinación.

Este punto de transición (protrusión de la radícula) también se caracteriza por la pérdida de tolerancia a la desecación y es un punto de control molecular (en *Arabidopsis* está regulado por ABI5), en donde un interruptor molecular de desarrollo genera la transición del programa de germinación al programa de desarrollo de plántula (Bewley y Black, 1994)

En la finalización de la germinación, la protrusión de la radícula depende del crecimiento de embrión, proceso dirigido por la toma de agua. Esta toma de agua es un proceso trifásico en donde hay una toma rápida inicial (fase I de imbibición), seguida de una fase de estabilización (fase II) y una tardía fase III en la cual se da un incremento en la toma de agua que ocurre solo cuando la germinación se ha completado, una vez que el eje embrionario se ha elongado y atravesado las estructuras de la cubierta (Schopfer y Plachy, 1984; Bewley, 1997b; Manz *et al.*, 2005). La elongación celular necesaria ha sido generalmente aceptada como suficiente para generar la protrusión de la radícula, mientras que la división celular es considerada como no esencial (Barroco *et al.*, 2005).

En estas fases el metabolismo celular se incrementa y el embrión reanuda su crecimiento activo, forzando el rompimiento de la cubierta seminal para permitir que emerja la radícula (Bewley, 1997). En etapas tempranas de la germinación se produce el proceso de imbibición, en donde se debilita la cubierta seminal hidratando el protoplasma, lo que hincha la semilla hasta que la testa cede (Crowe y Crowe, 1992). Además de este proceso físico, a partir de la entrada del agua a la semilla se activan las enzimas presentes y el sistema de síntesis de proteínas, lo que permite la formación de sustancias necesarias para el desarrollo (Chen *et al.*, 2011). Durante la segunda fase, la absorción de agua y la respiración son procesos constantes (Bewley y Black, 1994), simultáneamente se hidrolizan el almidón, los lípidos y las proteínas del endospermo en azúcares, ácidos grasos y aminoácidos, que son compuestos simples solubles y móviles. Posteriormente, estas sustancias se movilizan hacia los puntos de crecimiento del eje embrionario, donde son usadas en los procesos de crecimiento, que permitirán el desarrollo de la radícula del embrión (Sierra, 2005).

Para muchas especies incluidas *Arabidopsis*, especies como *Nicotiana*, *Lepidium sativum*, *Petunia hybrida*, la germinación es un proceso que se presenta en dos etapas, una primera ruptura de la testa y una posterior ruptura del endospermo los cuales son dos eventos secuenciales, visibles, distintos y separados en el tiempo durante la germinación (Karszen, 1976; Hopher y Roberts, 1985; Leubner-Metzger *et al.*, 1995, Krock *et al.*, 2002, Petruzzelli *et al.*, 2003, Leubner-Metzger, 2003; Liu *et al.*, 2005). En semillas endospermicas, tanto la testa como el endospermo contribuyen a la latencia de tipo físico (Hilhorst, 1995; Bewley, 1997a; Leubner-Metzger, 2003b). El endospermo es el principal obstáculo para la germinación en semillas de Asteraceae (lechuga), Solanaceae (tomate y tabaco) y Rubiaceae (café). En estos casos, el debilitamiento del endospermo micropilar es requerido para la protrusión de la radícula y está relacionado

con la hidrólisis de paredes celulares por enzimas hidrolíticas (Hilhorst, 1995; Bewley, 1997a; Koornneef *et al.*, 2002; Leubner-Metzger, 2003b).

Los carbohidratos solubles están implicados en la regulación de diferentes procesos metabólicos y de desarrollo vegetal (Rolland *et al.*, 2006). Son recursos de energía para los procesos biosintéticos, funcionan también como agentes osmóticos y contribuyen al mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática (Dierking y Bilyeu, 2009). El desarrollo seminal y embrionario están influenciados por los contenidos de azúcares y nitrógeno, estos actúan como señales de desarrollo además de su rol nutricional (Smeeckens, 2000). Durante la germinación, el desarrollo heterotrófico de la plántula depende de las reservas de carbohidratos almacenados en la semilla. Los carbohidratos pueden ser transportados desde el endospermo u otro órgano de la semilla hasta el coleóptilo y raíces, en donde es requerido para metabolismo de estos tejidos en pleno y activo desarrollo (Bewley, 1997)

Durante el desarrollo de la semilla los cambios en el contenido de carbohidratos se dan como una disminución en el contenido de monosacáridos, mientras que, el contenido de oligosacáridos se incrementa, pero durante el proceso de germinación este patrón es inverso (Vertucci y Farrant, 1995). En este proceso los lípidos se convierten en oligosacáridos solubles y sacarosa la cual es utilizada en el eje embrionario para la rápida expansión y crecimiento. La glucosa y fructosa son convertidas en hexosa quinasa para producir hexosa fosfatos para el subsecuente metabolismo. La función de la sacarosa fosfato sintasa es sintetizar sacarosa en el cotiledón durante la germinación a partir de productos almacenados como lípidos, mientras que la sacarosa sintasa funciona degradando sacarosa transportada desde el cotiledón al eje en crecimiento durante la germinación (Kuo *et al.*, 1990)

La sacarosa es el recurso de carbono primario translocado desde las hojas a los embriones en crecimiento. Este disacárido junto con los oligosacáridos de la familia de la rafinosa son los carbohidratos solubles más abundantes (Peterbauer y Richter, 2001); pero, son solo una pequeña porción del total de carbohidratos solubles presentes en las semillas (Ziegler, 1995). La tasa de toma de sacarosa en el embrión disminuye con la madurez fisiológica. El inicio del catabolismo de sacarosa en el embrión se da para proveer el carbono necesario para el almacenamiento de productos y la respiración (Peterbauer y Richter, 2001). Islam *et al.* (2008) encontraron en semillas de *Vigna unguiculata* L. Walp que las semillas con un alto porcentaje de germinación poseen altos contenidos de sacarosa, lo que sugiere el uso de este azúcar en el proceso de germinación y desarrollo de la plántula. Por su parte Xu *et al.* (1989) indicaron que la sacarosa es un recurso producido en los cotiledones para el proceso de germinación.

Murata *et al.* (1968) y Palmiano y Juliano (1972) indicaron que el almidón es degradado por la acción de las α y β amilasas en azúcares reductores como glucosa y otros como maltosa, y no reductores como sacarosa. La glucosa producida en el endospermo se mueve al escutelo (en semillas gramíneas) y allí por acción de la sacarosa fosfato

sintasa es convertido en sacarosa, forma en la que puede ser transportado a tejidos en crecimiento del tallo y raíz (Scofield *et al.*, 2007). La acumulación de sacarosa en semillas de arveja durante la germinación puede estar relacionada con la movilización de grandes cantidades de reservas presentes en los cotiledones en donde la fructosa y pequeñas cantidades de glucosa se acumulan en el eje embrionario, siendo estos el sitio de mayor degradación de sacarosa (Koornneef *et al.*, 2002).

El papel de los azúcares en la germinación es complicado y está asociado a la biosíntesis y señalización hormonal, en particular con ABA (Gibson, 2004; Yuan y Wysocka-Diller, 2006). Estudios genéticos realizados por diferentes investigadores han demostrado que la glucosa, junto con otros azúcares, son moléculas de señalización primaria que afectan la germinación y el desarrollo temprano de la plántula, el crecimiento de la raíz y el desarrollo de senescencia (Dekkers *et al.*, 2004; Gibson, 2005, Gibson, 2000; Dekkers *et al.*, 2004; Gibson, 2005). Por su parte, Chen *et al.* (2006) reportan que la germinación puede ser retrasada en presencia de glucosa, lo cual ha sido atribuido al incremento en la expresión de genes de biosíntesis de ABA y al efecto de la glucosa en genes de catabolismo de ABA.

La imbibición y la activación metabólica son un fuerte estrés para la semilla (Bewley, 1997; Bailly, 2004; Kranner y Birtic, 2005). El estrés comúnmente es generado por la acumulación de ROS (reactive oxygen species), generando un ambiente más oxidativo en la célula, un daño de macromoléculas (Moller *et al.*, 2007) y muerte celular (Kranner *et al.*, 2006). Las semillas activan su sistema antioxidante en la rehidratación (Kranner y Birtic, 2005) como se ha demostrado para semillas de pino y avena (De Gara *et al.*, 1997; Tommasi *et al.*, 2001). Así mismo la importancia de la maquinaria antioxidante para una rehidratación óptima ha sido bien documentada en plantas de la resurrección *Myrothamnus flabellifolia* (Kranner *et al.*, 2002). Las enzimas, superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD) y catalasa (CAT) son consideradas como las principales enzimas protectoras encargadas de remover radicales libres y especies reactivas de oxígeno (Blokhina *et al.*, 2003; Devi *et al.*, 2005) y son de particular importancia para la germinación (Prodanovic *et al.*, 2007). Las peroxididasas son una serie de metaloenzimas de tipo oxido-reductasa que tienen un átomo de Fe³⁺ coordinado con dos átomos de nitrógeno de anillos pirrólicos de residuos de histidina. Se localiza en el citoplasma de forma soluble y en la pared celular mediante enlaces iónicos o covalentes (Grisom y Pilet 1984). El Fe³⁺ cambia de estado de oxidación a Fe²⁺ como consecuencia de la reducción del H₂O₂ formando un catión (oxo fenil protofirina), que en el siguiente paso es reducido aceptando un electrón de una molécula donora de hidrógenos (Smith *et al.*, 2002).

Las proteínas son uno de los principales productos almacenados presentes en semillas, así como los lípidos y oleosinas (Novod, 2009). Dentro de las proteínas almacenadas se incluyen las proteínas de reserva, las proteínas de mantenimiento, las enzimas bioactivas

y otras proteínas (inhibidores de proteasas, lectinas y alérgenos) clasificadas como proteínas menores. Durante la germinación y desarrollo de la plántula, las proteínas almacenadas insolubles son degradadas por proteasas y convertidas en péptidos solubles. Posteriormente, por la acción de hidrolasas se generan aminoácidos libres. Estos aminoácidos libres están disponibles para su transporte al eje embrionario y con el objeto de soportar su crecimiento actuando como un recurso de energía (Shutov y Vaintraub 1987; Bewley y Black 1994; Muntz *et al.*, 2001).

El presente estudio tuvo como objetivo identificar las etapas del proceso de germinación de semillas de *Annona squamosa* L. y describir algunos cambios en anatomía, contenido de carbohidratos, proteína y actividad enzimática peroxidasa.

2.1 Metodología

Material vegetal

El material seleccionado hace parte de las accesiones colectadas para el desarrollo del proyecto del Banco Colombiano de Germoplasma de Anón, enmarcado en el programa: Material de Siembra y Mejoramiento Genético del Anón (*Annona squamosa* L.). Se seleccionaron las accesiones colectadas en el municipio de Apulo, Cundinamarca, debido a que los individuos se encuentran distribuidos en agroecosistemas y no en solares o de forma espontánea en jardines. Se emplearon semillas de *A. squamosa* L. obtenidas de frutos colectados de las accesiones C2AS224 (C: Cundinamarca; 2: código de municipio; AS: especie *Annona squamosa* L.; 224: número de consecutivo), C2AS225 y C2AS226. A partir de frutos maduros y blandos al tacto, los cuales se lavaron con agua a temperatura ambiente para remover cualquier residuo presente en su superficie, se separó el exocarpo del mesocarpo (pulpa). Posteriormente, se retiró manualmente la semilla de la pulpa y el arilo, luego de lo cual se lavaron con agua y se colocaron en toallas de papel absorbente a temperatura ambiente, con el fin de secarlas hasta una humedad del 10%. Las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 9 minutos, lavándolas posteriormente con etanol al 96%, y agua destilada (tres veces).

Análisis morfológico y preparación del material

Para el análisis morfológico y la determinación de sacarosa, glucosa, fructosa, proteína y actividad peroxidasa en las semillas, se emplearon los tratamientos (estados de germinación): 1) semillas de anón maduras y sin germinar con humedad del 10%, 2) semillas imbibidas en agua destilada durante 72 horas, 3) semillas con ruptura de testa, y 4) semillas con ruptura de endospermo y protrusión de radícula. Para el ensayo de determinación de azúcares solubles totales, adicionalmente se emplearon tres diferentes estados de crecimiento de radícula: longitud > 3 mm, y > 10 mm. La germinación de semillas se realizó en bandejas con sustrato turba rubia (Klassmann ®) sin nutrientes, a una profundidad equivalente al doble de su longitud y colocadas posteriormente en un

fitotrófon Conviron CMP3244 durante 30 días a una temperatura de 35 °C, en ausencia total de luz ya que las semillas de *Annona squamosa* L. son indiferentes a las condiciones de luz (Ferreira *et al.*, 1997). Las observaciones de los cambios morfológicos se realizaron con ayuda de un estereoscopio Leica zoom 2000, empleando 30 semillas sin germinar, semillas imbibidas, semillas con ruptura de testa y semillas con ruptura de endospermo y protrusión de radícula. Se realizó un registro fotográfico de cada estado.

Análisis anatómico

Teniendo en cuenta que los tejidos seminales de *A. squamosa* L. son altamente resistentes al corte debido a la característica dura y leñosa de la testa, el protocolo de Sandoval (2005), para tejidos vegetales blandos empleado en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Agronomía, se adaptó y modificó para obtener cortes en donde los tejidos estuviesen bien definidos y presentaran continuidad. Por lo tanto la metodología presentada es el resultado de este proceso.

Semillas completas de *Annona squamosa* L. con un 10% de humedad fueron imbibidas en agua destilada durante 72 horas. Posteriormente, las semillas fueron incluidas en una solución de fenol al 50% durante 24 horas con el objetivo de ablandar las testas. Se realizaron cortes de interés preliminares con la ayuda de un escalpelo número 23. Los cortes se hicieron de modo que se evidenciara la anatomía seminal en diferentes vistas y la asociación de los diferentes tejidos.

Los cortes fueron colocados puestos en casetes plásticos e inmersos en solución fijadora de Bouin (1897), durante 48 horas a temperatura ambiente para detener el deterioro de los tejidos. Los casetes con los cortes y luego de retirada la solución fijadora, fueron pasados por un gradiente de concentraciones de etanol al 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96 y nuevamente 96%, cada uno por un lapso de 24 horas. Posteriormente los cortes fueron inmersos por 24 horas en alcohol absoluto, seguidamente se imbibieron en *Ter-butanol* durante 24 horas. Luego de lo anterior, los cortes fueron imbibidos por 24 horas y a 60 °C en 4 concentraciones graduales de parafina fundida a 56 °C y *Ter-butanol*, incrementando cada vez la concentración de parafina y disminuyendo la concentración de *Ter - butanol* así: a) 25% de parafina:75% *Ter-butanol*, b) 50% de parafina:50% *Ter-butanol*, c) 75% de parafina:25% *Ter-butanol*, y d) 100% parafina. Se confeccionaron los bloques y se procedió a la realización de los cortes con el micrótopo; los bloques fueron sumergidos en una solución de ácido clorhídrico al 50% de por dos horas. Luego de este tiempo, fueron lavados con abundante agua y puestos en cama de hielo con el objetivo de incrementar la solidez de la parafina. Se realizaron cortes de 7 µm con el micrótopo. Con ayuda de un pincel, los cortes fueron puestos en baño de flotación a 50°C. Los cortes fueron capturados con ayuda de una lámina porta objetos previamente tratada con la albúmina de Mayer (Johansen, 1940). Posteriormente, los cortes fueron desparafinados colocándolos en el horno a 60°C durante 24 horas. Seguidamente y para remover completamente la parafina de las láminas, se pasaron dos veces durante 10

minutos por xilol y posteriormente dos veces durante 10 minutos por etanol al 96%. El proceso de tinción se realizó con Safranina – Fast Green. Finalizado el proceso de tinción, las láminas se limpiaron y se aplicó historesina sobre los cortes sellando con una lámina cobre objetos. Las documentaciones y observaciones fueron hechas con microscopio marca Olympus CX31 y la edición de imágenes con el software Image – Pro Plus®.

Determinación de azúcares

Las determinaciones de azúcares fueron realizadas en el laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal del departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Una vez obtenido el material de cada etapa de germinación se realizó la extracción de embriones y endospermo con ayuda de un estereoscopio hasta obtener 100 mg del material requerido por réplica (Moreno *et al.*, 2010).

La determinación de carbohidratos solubles totales se realizó por colorimetría empleando el método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956) usando glucosa como estándar (1,00 mg/mL) y fue expresada como mg/g de peso fresco. La extracción de carbohidratos se realizó con agua destilada y la reacción realizada en un tubo de 2,0 mL en donde se mezclaron 180 µl de agua destilada, 30 µL del extracto y sobre cada mezcla 200 µL de fenol 80%. Posteriormente, se adicionó 1,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se dejó enfriar a temperatura ambiente (15 °C) en oscuridad durante 36 horas y se leyó absorbancia a 490nm con un lector de microplacas Biorad®.

El método de análisis de Dubois y colaboradores (1956) empleado en la determinación de azúcares solubles totales es sensible, rápido y exacto; sin embargo determina azúcares reductores, no reductores, sustituidos y polímeros, por lo que resulta una medida muy gruesa de la dinámica de carbohidratos en la germinación de *A. squamosa* L. Por lo anterior, se determinó la dinámica de sacarosa, glucosa y fructosa mediante el uso de cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC.

El análisis por HPLC fue realizado tomando 100 mg de embriones y endospermos de los respectivos tratamientos de semillas los cuales fueron macerados con nitrógeno líquido, seguidamente fueron puestos en tubos de reacción de 2 mL a los que se les agregó 1 mL de etanol al 80% a 90°C, posteriormente, se centrifugó 10 minutos a 6000 rpm a 20°C y se extrajo el sobrenadante. El pellet se resuspendió dos veces más con 1 mL de etanol al 80% a 90°C siguiendo el mismo proceso hasta obtener 3 mL de sobrenadante. El sobrenadante fue llevado a secado en un Speed Vac obteniendo un concentrado en polvo el cual fue resuspendido en 1 mL de agua destilada. El extracto concentrado fue centrifugado de nuevo a 6000 rpm durante 15 minutos y filtrado en un filtro de 0,45 µm. Las muestras fueron analizadas en un HPLC WATERS con una columna Phenomenex Ca⁺⁺ Monosacharide de 30cm X 8mm, con autosampler, horno y detector de índice de refracción. La fase móvil fue agua tipo I. El horno estuvo a una temperatura de 85°C y el detector a 44°C. Los datos fueron interpolados con la curva de calibración empleando

como estándar sacarosa, glucosa y fructosa en 1,00 mg/mL. Finalmente, los datos se expresaron en mg/g peso fresco.

Determinación de proteína y actividad enzimática peroxidasa

Preparación de muestras

Se tomaron 0,1000g de macerado de semilla en los estados de germinación mencionados y puestos en un tubo de reacción de 2,0 mL tipo eppendorf de fondo cónico. Se agregaron 0,0220 g de PVPP (22,0% p/p); posteriormente, se adicionaron 1,5 mL de acetona 80% v/v a -10°C (Lichtenthaler, 1987). Se centrifugó durante tres minutos, a 8000 rpm y 4°C. El sobrenadante se retiró y eliminó usando una micropipeta y el sedimento se transfirió a un tubo de reacción tipo falcon de 15mL con lavados sucesivos en buffer fosfatos de sodio 100mM conteniendo 3,82% p/v PVP-40, pH 7,2 hasta completar 4,4mL a 4 °C. Posteriormente, se procedió a agitar durante una hora sobre cama de hielo (4 °C) en agitador horizontal. Finalmente, se centrifugó por una hora a 6000rpm y 4°C. Se separó el sobrenadante (extracto enzimático) para la determinación de proteína total y actividad enzimática peroxidasa.

Proteína

La determinación se realizó con base en la metodología descrita por Bradford (1976) y Zor y Selinger (1996). En una microplaca por triplicado se agregaron 1 µL de extracto enzimático que correspondió a los tratamientos de semillas, 24 µL de agua destilada y 200 µL de reactivo Bradford. La microplaca se puso en agitación por cinco minutos y luego fue puesta en el Lector de placas iMark de Biorad para lectura de absorbancia a 590nm.

Con el fin de obtener una curva de calibración, en otra microplaca, se pusieron 25 µL de BSA tanto en el primero como en el segundo pozo, al segundo pozo se le agregaron 25 µL de PBS y se mezcló bien con la micropipeta, luego, se extrajeron 25 µL de la solución de ese pozo. Este proceso se repitió otras cinco veces para tener al final 7 pozos con el mismo volumen (25 µL) y la mitad de la concentración de BSA del pozo anterior. Esto se hizo por triplicado. La microplaca se puso en el Lector de placas iMark de Biorad® y se midió la absorbancia a 590nm. Al final se calculó la cantidad de BSA presente en cada pozo y se realizó una curva de µg de BSA (eje x) contra absorbancia a 590nm (eje y). Al final, por regresión lineal se halló la ecuación de la recta y se despejó x, que indica la cantidad de proteína y se reemplazó por los valores de absorbancia determinados en el paso anterior, de esta forma se definió la cantidad de PVPP con la cual se obtuvo una mayor cantidad de proteína y la cantidad de proteína en las muestras.

Actividad enzimática peroxidasa

La actividad enzimática peroxidasa se determinó por medio del método modificado de guayacol/peróxido (Dalisay y Kúc, 1995; Kireyko et ál., 2006) en un espectrofotómetro Genesys® a 436nm. La peroxidasa es una enzima que cataliza la oxidación de ciertos compuestos dadores de hidrógeno, como fenoles (guayacol, pirogalol) y aminas aromáticas (o-fenilendiamina) por medio de peróxidos (H₂O₂). El sustrato oxidable más usado es el guayacol, que es oxidado a un complejo coloreado de tetraguayacol en presencia de peroxidasa. La velocidad de formación del color rojo ladrillo puede ser utilizada como medida de la actividad enzimática por lecturas espectrofotométricas de las absorbancias en relación con el tiempo (Schmidt y Pennacchiotti, 2001).

La unidad de actividad enzimática (UAE) específica peroxidasa (POD) se define como (Moreno et al., 2010):

$$U_{pod} = \frac{\Delta A \text{ 436 nm}}{\Delta \text{ minuto} \times \text{mg material vegetal}}$$

2.2 Resultados y discusión

Morfo anatomía de la germinación de las semillas de *Annona squamosa* L.

La germinación de las semillas maduras de *A. squamosa* L. es un proceso que se presenta en dos etapas separadas y consecutivas: la ruptura de la testa y posteriormente la ruptura del endospermo. La semilla madura y seca presenta un embrión poco desarrollado pero con tejidos bien diferenciados en donde es fácilmente distinguible el plug micropilar, el embrión y el endospermo. Así mismo, puede observarse una región fracturada en inmediaciones de la cubierta seminal que puede constituir el espacio de la pericalaza (Figura 2-2 A y 2-4 A).

Durante la imbibición, la semilla se dilata y se dan cambios en su tamaño (Figura 2-1 H). El proceso de germinación inicia con una absorción rápida de agua (fase I, imbibición) que se da durante las primeras 17,6 horas de las 72h de imbibición, en donde en comparación con la semilla seca (Figura 2-1 A) el embrión se ha expandido (Figura 2-2 B); seguidamente, se presenta la *primera etapa de germinación con la ruptura de la testa* (Figura 2-1 B), evento que sin ningún tratamiento pregerminativo se da entre los 10 y 15 días de incubación. Esta ruptura es debida al incremento en el volumen del endospermo y al incremento en tamaño del embrión (Figura 2-2 C) La ruptura de la testa inicia en el plug micropilar, conformado por un tejido endotestal poco denso y con una región de fractura bien definida (Figuras 2-2 A y 2-2 B). A continuación, entre el día 15 y 20 de incubación, se presenta la *segunda etapa de germinación con la protrusión y ruptura del endospermo*, observándose cómo restos del plug micropilar son expelidos (Figura 2-1 C

y 2-4 A), y consecuentemente la *protrusión de la radícula* (figuras 2-1 D y 2-4 B) lo que se denomina germinación en sentido estricto. La fase de toma de agua continúa durante la transición al crecimiento de la radícula y la plúmula (aun dentro de la semilla) en donde se presenta la formación de raíces laterales (fase III de toma de agua) (figuras 2-1 F, 2-1 G y 2-3 C).

Reportes de germinación en dos etapas como los descritos para *A. squamosa* L. fueron encontrados para *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 2005), *Lepidium* (Muller, *et al.*, 2006), y tabaco (Liu *et al.*, 2005; Manz *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2006). Esta condición de germinación ha sido descrita también en *Trollius* sp. (Ranunculaceae; Hopher y Roberts, 1985), *Chenopodium* sp. (Amaranthaceae; Karssen, 1968; Karssen 1976), *Nicotiana* y *Petunia* (Cestroideae subfamilia de Solanaceae, Leubner-Metzger *et al.*, 1995; Krock *et al.*, 2002; Petruzzelli *et al.*, 2003).

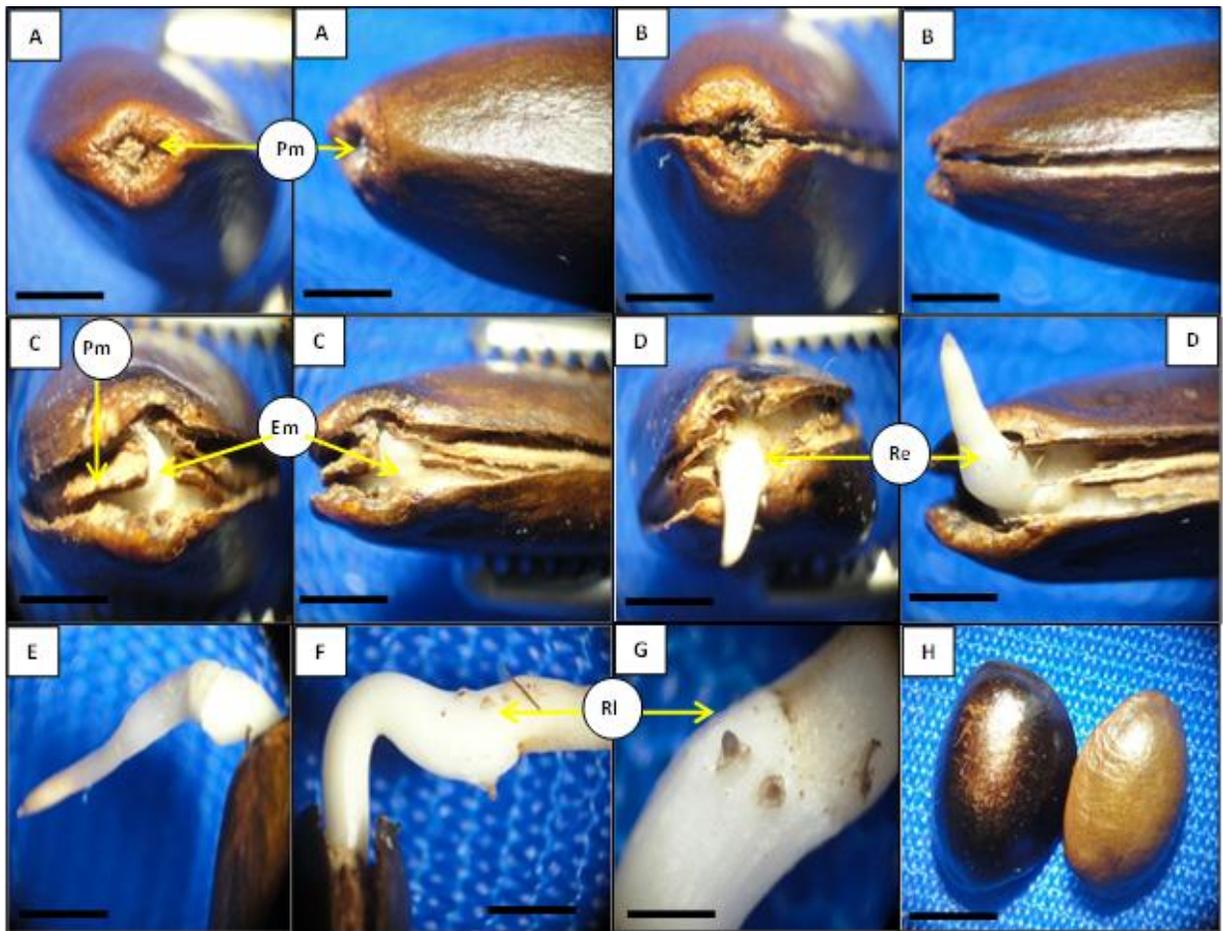


Figura 2-1. Germinación en dos etapas de semillas de *A. squamosa* L. (A-F) eventos visibles durante la germinación tras 30 días de incubación a 35°C y HR de 60% en turba húmeda. (B y C) primera etapa: ruptura de la cubierta seminal. (D y E) segunda etapa: ruptura de endospermo y

elongación de la radícula. (A) semilla imbibida intacta previo a la ruptura de la cubierta seminal. (B) semillas con ruptura de la cubierta seminal. (C) semillas con protrusión de endospermo. (D) semillas con ruptura de endospermo y elongación de radícula. (E) elongación de la radícula, (F-G) formación de raíces laterales. (H) semilla imbibida (72 horas en agua) y semilla con 10% de humedad, respectivamente. Pm plug micropilar, Em endospermo micropilar, Re radícula elongada, RI raíz lateral. Barras de escala: A – D = 3 mm; E- F= 4 mm; G= 2 mm; H=7 mm.

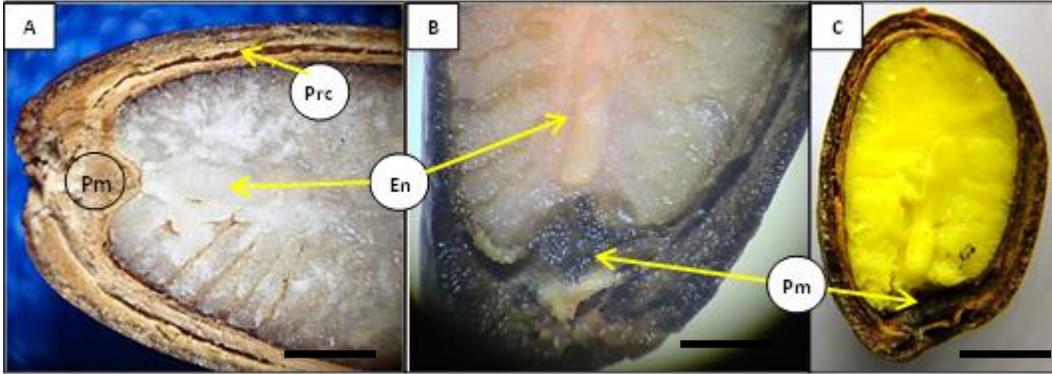


Figura 2-2. Semilla madura y primera etapa de germinación de semillas de *A. squamosa* L. (A) semilla con 10% de humedad, (B) semilla imbibida intacta previo a la ruptura de la cubierta seminal y (C) semillas con ruptura de la cubierta seminal. (B-C) eventos no visibles durante el proceso de germinación tras 30 días de incubación a 35°C y HR de 60% en turba húmeda, tinción con trifenil tetrazolio y reactivo Bouin, respectivamente. Pm plug micropilar, En embrión, Prc pericalaza. Barras de escala A y B= 3 mm; C = 6 mm.

En post-germinación (Figura 2-1 F) se presenta la formación e inducción de raíces laterales. Estas se producen en la radícula de forma endógena a partir del periciclo (Figura 2-3 B). Se inician por divisiones anticlinales y periclinales en un grupo de células que forman el primordio de la raíz lateral, que crece y penetra en el córtex. En las figuras 2-3 A y 2-3 B se puede observar el inicio de las divisiones en el periciclo. Se puede observar la formación de las raíces laterales en frente de los dos polos xilemáticos que se evidencian en el corte (Figura 2-3 E). Se observa cómo el primordio de raíz lateral en desarrollo crece y atraviesa el córtex y la epidermis de la raíz primaria (Figuras 2-3 C, 2-3 D y 2-3 E) lo cual se logra mediante lisis enzimática o simple acción mecánica (Alonso, 2011). En principio, no hay una conexión entre el cilindro vascular de la raíz primaria y el de la raíz lateral. Soportes de literatura referencian que la conexión se hace por medio de unas células de transición derivadas del periciclo o del parénquima que conectan ambos cilindros vasculares. Estas células de transición son llamadas células interpuestas, que se diferencian a elementos cribosos o vasos del xilema (Alonso, 2011).

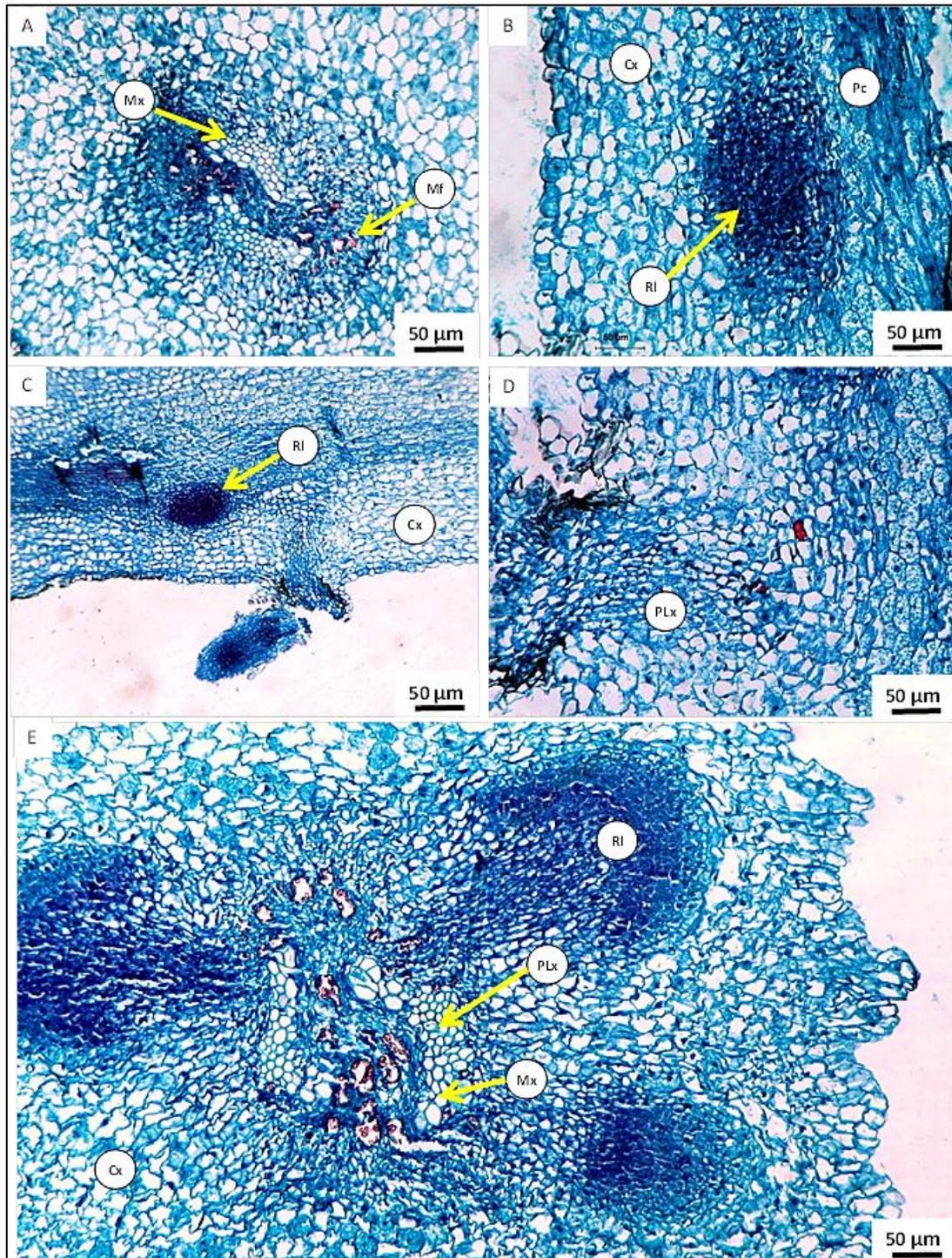


Figura 2-3. Formación de raíces laterales en semillas con protrusión de radícula. (A) cambios en el tejido cortical, tejidos conductores definidos y en desarrollo. (B) y (C) Sección longitudinal de raíz lateral en formación. (D) formación de polo xilemático en raíz lateral. (E) sección transversal de radículas evidenciando la formación de tejido conductor metafloema y metaxilema y raíces

laterales frente a los polos xilemáticos. *Mx* metaxilema, *Mf* metafloema, *Cx* cortex *PLx* polo xilemático, *RI* raíz lateral, *Pc* periciclo. Aumento A-D = 10X; E= 40X.

En el estudio anatómico se observa cómo en las semillas de *A. squamosa* L. el endospermo muestra un engrosamiento en las paredes celulares (Figura 4A), lo cual se debe a galactomananos que se encuentran depositados en las paredes celulares (Buckeridge *et al.*, 2000). Sin embargo, en la región micropilar se observan paredes delgadas. Esta modificación se presenta debido a que en esta zona el endospermo debe ser menos resistente a la protrusión de la radícula generada por el crecimiento del embrión (Da Silva *et al.*, 2007). Una condición similar fue observada por Melo *et al.* (2006), en *A. crassiflora*.

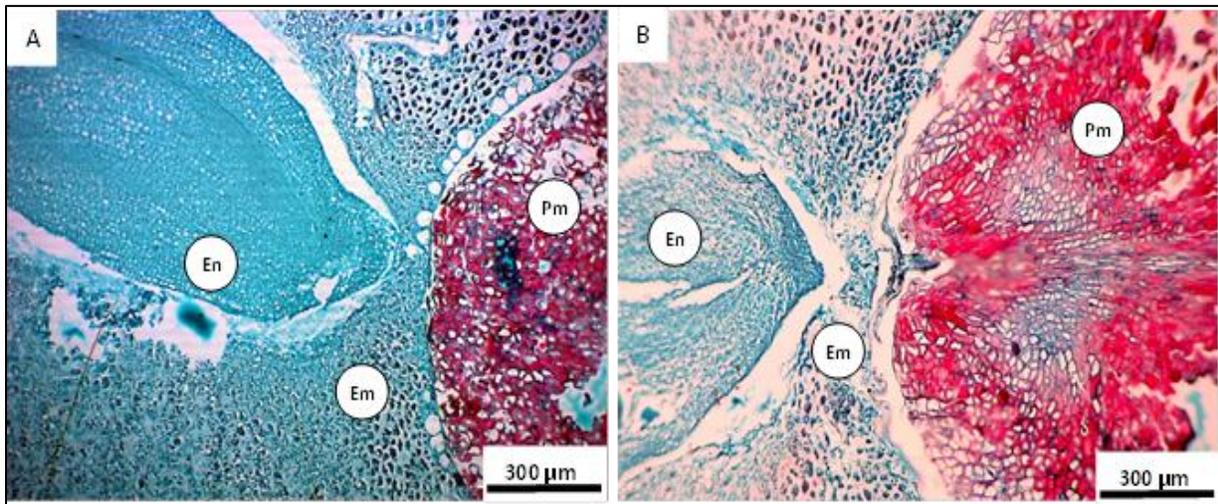


Figura 2-4. Sección longitudinal de embrión, endospermo micropilar y plug micropilar en el proceso de germinación. Nótese en (A) la disposición celular del plug micropilar y (B) la formación de la región de fractura (flecha amarilla). *En* embrión, *Em* endospermo, *Pm* plug micropilar. Flecha amarilla: región de fractura. Aumento =

En la figura 2-5 se presentan semillas sin testa en donde se aprecian endospermos después de la imbibición (der. 2-5 A), en la etapa de ruptura de testa (en los que se puede observar protrusión del endospermo) (izq. 2-5 A), en la ruptura del endospermo y la protrusión de la radícula (2-5 B) y en el crecimiento post germinativo (2-5 C). El cambio en tamaño y forma del endospermo y su protrusión en la ruptura de testa podrían ser indicativos del debilitamiento del endospermo, y por consiguiente de la disminución de la resistencia mecánica impuesta por este, la cual es necesaria para que la germinación se complete en *Annona squamosa* L. Lo anterior es soportado por los resultados encontrados en el capítulo dos, en donde se observó cómo las semillas presentan latencia morfofisiológica compleja no profunda, en la cual además de un bajo potencial de crecimiento del embrión, el tejido endospermático y la testa restringen el crecimiento de este (Bewley, 1997; Bradford *et al.*, 2000; Hegashi *et al.*, 2002; Taiz y Zeiger, 2006). En *Trollius* (Hepher y Roberts, 1985), *Chenopodium* (Karszen, 1976) y varias solanáceas

como tomate y tabaco y asteráceas como lechuga (Hilhorst, 1995; Bewley 1997a, Leubner Metzger, 2003) el endospermo actúa como una barrera para la protrusión de la radícula y así mismo para la finalización de la germinación en semillas de angiospermas.



Figura 2-5. Cambios morfológicos en el endospermo de *A. squamosa* L. (A) der. endospermo de semilla imbibida intacta previo a la ruptura de la cubierta seminal; izq. endospermo de semilla con ruptura de la cubierta seminal. (B) endospermo de semillas con ruptura de endospermo y elongación de radícula y (C) elongación de la radícula, cotiledones imbibidos en el endospermo. Ep endospermo protruido

El debilitamiento del endospermo puede estar relacionado con la actividad de la enzima endo β -mannanasa asociada a la hidrólisis de galactomananos contenidos en las paredes celulares de muchas especies incluyendo *Datura ferox* (Sanchez y de Miguel, 1997), *Solanum*, *Lycopersicum* (Groot *et al.*, 1988) y *Coffea arabica* (da Silva *et al.*, 2004). Los autores coinciden en que como resultado del debilitamiento del endospermo se da la liberación de carbohidratos que constituyen un suministro de energía para el crecimiento del embrión y se reducen las restricciones mecánicas para el crecimiento de la radícula. Al respecto Bewley (1997a) señala que la endo β -mannanasa está involucrada en el debilitamiento de endospermo, aunque también la β -1,3-glucanasa en respuesta a luz, giberelinas, etileno y ABA ha sido relacionada como reguladora de la germinación (Leubner-Metzger y Meins, 1999).

En semillas de *Annona crassiflora* el comienzo del crecimiento del embrión coincide con la aparición de la actividad endo β -mannanasa alrededor de la cavidad embrionaria en la región micropilar del endospermo y subsecuente mente se difunde hacia el endospermo lateral. La endo β -mannanasa tiene la función de degradar el endospermo para así suministrar compuestos ricos en energía al embrión, pero también para crear espacio en la cavidad embrionaria con el objeto de acomodar el embrión durante su crecimiento antes de la protrusión de la radícula (da Silva *et al.*, 2004). En *Annona squamosa* L. el debilitamiento del endospermo puede estar relacionado con la acción de enzimas hidrolíticas. Evidencia de esto es el efecto de la aplicación exógena de GA3 sobre las variables de germinación (capítulo 2). Con la aplicación de giberelinas se promueve el debilitamiento del tejido endospermático (Bewley, 1997; Bradford *et al.*, 2000; Hegashi *et*

al., 2002; Taiz & Zeiger, 2006) debido a la síntesis de varias enzimas hidrolíticas involucradas en la solubilización de reservas, entre las cuales está las α y β -amilasas (Taiz & Zeiger, 2006).

Cambios en el contenido de carbohidratos durante la germinación.

Azúcares solubles totales

En semillas sin germinar se observa que el valor de concentración de azúcares solubles en el embrión (313 mg/g) decrece con 72 horas de imbibición (265 mg/g) y en las dos etapas de germinación evaluadas, ruptura de testa (195 mg/g) y protrusión de la radícula (ruptura de endospermo) (126 mg/g), en donde el valor de concentración disminuyó en 59,73%, en comparación con los embriones de semillas sin germinar. Después de la protrusión de la radícula, se presenta una leve disminución en la concentración de azúcares solubles en el embrión (101,1 mg/g) cuando la radícula alcanzó una longitud mayor a 10 mm (Figura 2-6). Los valores de concentración disminuyeron levemente en el endospermo de semillas con 72 horas de imbibición (110,4 mg/g) y no variaron en endospermos de semillas con protrusión de radícula y posterior crecimiento de ésta. Cuando se presentó la ruptura de la testa, la concentración de azúcares solubles del endospermo fue de 140,9 mg/g lo que representa un incremento en 27% con respecto a las semillas sin germinar (126,6 mg/g) (Figura 2-6).

Los resultados muestran una diferencia en los contenidos y dinámica del cambio en la concentración de carbohidratos solubles en los dos órganos evaluados. En el endospermo se detectaron contenidos más bajos de azúcares que en el embrión en todos los estados evaluados. En anonáceas los lípidos, proteínas y amidas son las principales sustancias de reserva, (Galastri, 2008) y se reportan altas demandas de azúcares por parte del embrión. Los embriones en desarrollo toman azúcares rápidamente y con su crecimiento en la germinación se incrementa la demanda por estos sustratos (Hill *et al.* 2003), lo que contribuye a bajar los niveles de azúcares en el endospermo. En el endospermo no se observa un decrecimiento en los niveles de azúcares solubles después de la imbibición, ni en los dos estados de germinación evaluados, aun cuando este órgano es el principal proveedor de carbono para el crecimiento del embrión en la germinación. Esto se debe a que tanto la conversión de lípidos y proteínas (a través de la gluconeogénesis desde aminoácidos (Stewart y Beevers, 1967)) a carbohidratos mantienen los niveles de azúcares estables en el endospermo (Kriedemann y Beevers, 1967; Kornberg y Beevers, 1957; Canvin y Beevers, 1961; Beevers, 1961).

En el embrión de *A. squamosa* L, los altos contenidos de azúcares se deben a las reservas movilizadas desde el endospermo, las cuales son indispensables para el desarrollo del embrión y la germinación (Aoki *et al.* 2006; Bewley y Black, 1994). Se requiere una gran acumulación de azúcares para disminuir los potenciales osmóticos de

las células y garantizar turgor (Singh, 2004) y así promover el crecimiento del eje embrionario (Giorgini y Suda, 1990).

La marcada disminución en la cantidad de azúcares del embrión después de la imbibición y en los dos estados de germinación evaluados, sugiere una rápida transformación y uso de azúcares como sustrato respiratorio para la división y elongación celular (Bewley y Black, 1994) y en diferentes procesos metabólicos (Giorgini y Campos, 1992).

Pese a que hay pocos estudios relacionados con metabolismo de azúcares durante la germinación, se han reportado resultados similares a los encontrados en el presente estudio. Satyanarayana *et al.* (2011), encontraron que en semillas de *Sterculia urens* Roxblos contenidos de azúcares solubles variaron de 1,70 mg/g a 0,8 mg/g del día 0 al día 15 de germinación. Giorgini y campos (1992), reportaron que en semillas de café (*Coffea arabica* L) el contenido de azúcares solubles totales en el embrión disminuyó rápidamente hasta los 40 días de germinación. En semillas de maíz, durante las primeras 48 horas de germinación hubo una gran disminución en el contenido de azúcares solubles en el embrión (Ingle y Hageman, 1965). Resultados acordes también fueron encontrados por Jaya y Venkataraman (1981) en *Cicer arietinum* L y *Vigna radiata* L y también en *Phaseolus vulgaris* (Kon *et al.*, 1973). Suda y Giorgini (2000) reportan que en semillas de *Euphorbia heterophylla* los azúcares solubles en el endospermo variaron muy poco con 72 horas de imbibición, declinando su contenido posteriormente en comparación con semillas latentes y secas.

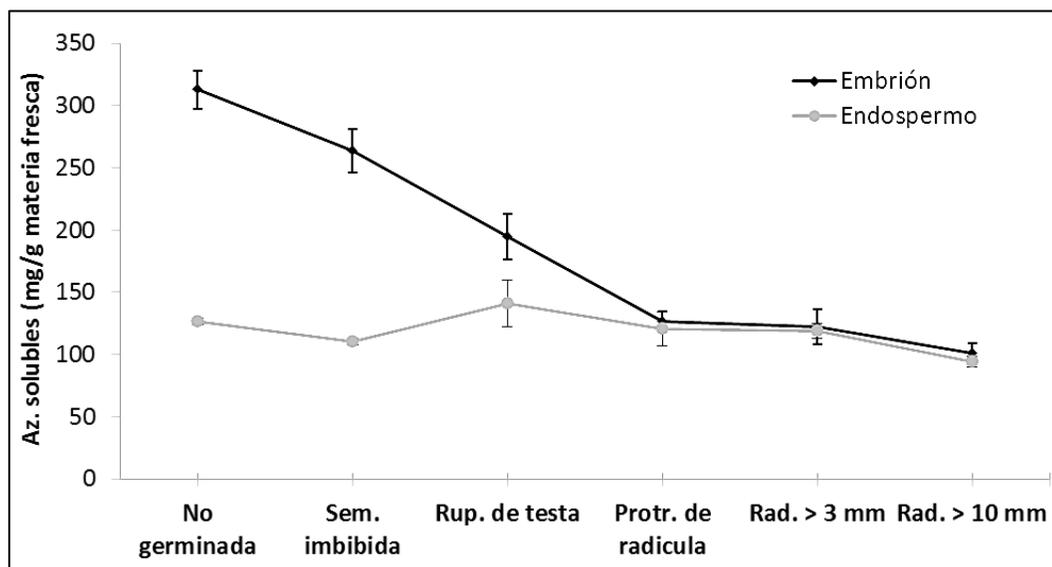


Figura 2-6. Cambios en la concentración (ug/mg de materia fresca) de azúcares solubles en embrión y endospermo de *A. squamosa* L. en: semillas sin germinar (*No germinada*); imbibición por 72 horas (*sem. Imbibida*); etapa I de germinación: ruptura de testa (*Rup. de testa*); etapa II de germinación: protrusión de radícula (*Protr. de radícula*); elongación de radícula > 3mm (*Rad. < 3 mm*) y elongación de radícula > 10mm (*Rad. < 10 mm*). Imbibición en agua por 72 horas y

posterior incubación para germinación a 35°C y HR de 60% en turba húmeda. Barras verticales indican error estándar (\pm); n= 4.

La sacarosa tiene el mismo patrón de comportamiento, que el presentado para azúcares solubles totales, en las dos estructuras evaluadas. En el embrión se presentó una reducción del 90% en su contenido, cuando las semillas fueron imbibidas durante 72 horas. En el endospermo los contenidos de sacarosa son considerablemente menores antes de iniciar germinación; adicionalmente, al igual que en el embrión, cuando las semillas son imbibidas su contenido disminuye en más del 80%, llegando a niveles similares a los del embrión. A pesar de ello después de la ruptura de la testa, los niveles llegan a 0,14 mg/g y sufren un leve incremento cuando se presenta la ruptura del endospermo y la protrusión de la radícula (4,29 mg/g) (Figura 2-7A). En *A. squamosa* L. se observan altos contenidos de sacarosa en los embriones de semillas sin germinar, lo que se debe a que en sistemas expuestos a desecación la concentración de sacarosa se incrementa hacia el final del periodo de maduración de la semilla con el objeto de proteger la integridad de la membrana (Koops y Groeneveld, 1990). Con la imbibición la concentración de sacarosa disminuyó en el embrión, lo que indica que hay un rápido metabolismo de este azúcar después de la activación metabólica de la semilla. La hidratación en el embrión activa la respiración y acelera su tasa gracias a la activación de mitocondrias preexistentes (He y Burris, 1992) y a la producción de nuevas mitocondrias, lo cual es típico en semillas que almacenan aceites (Morohashi and Bewley, 1980; Morohashi, 1986), como en el caso de las semillas evaluadas.

En el endospermo de *A. squamosa* L se presenta un incremento en las cantidades de fructosa y glucosa después de la imbibición, lo que sugiere que la hidrólisis de sacarosa puede ser más intensa en el embrión en este periodo de germinación (Figura 2-7 B). En el caso de glucosa, posterior al incremento en la concentración de glucosa al finalizar la imbibición (1,36 mg/g), se observa un decrecimiento de este azúcar en las etapas de ruptura de la testa (0,15 mg/g) y protrusión de radícula (0,17 mg/g). En estas mismas etapas, el contenido de glucosa en el embrión presenta un fuerte incremento principalmente en la protrusión de la radícula (5,28 mg/g), lo cual es evidencia de que en esta etapa de germinación puede haber removilización de este azúcar, desde el endospermo hasta el embrión (Figura 2-7 B).

Similar a lo ocurrido en el endospermo, la fructosa en el embrión incrementa después de 72 horas de imbibición (0,48 mg/g) y cuando se presenta la protrusión de la radícula (1,94 mg/g) (segunda etapa de germinación), mientras que en la ruptura de la testa (primera etapa de germinación), los niveles de este azúcar no varía con respecto a la imbibición (0,51 mg/g). Aunque la dinámica del cambio en las concentraciones de fructosa son similares en los dos órganos, los valores de concentración son mucho menores en el embrión que en el endospermo, en donde los valores alcanzan hasta 3,35 mg/g en la protrusión de la radícula (Figura 2-7 C).

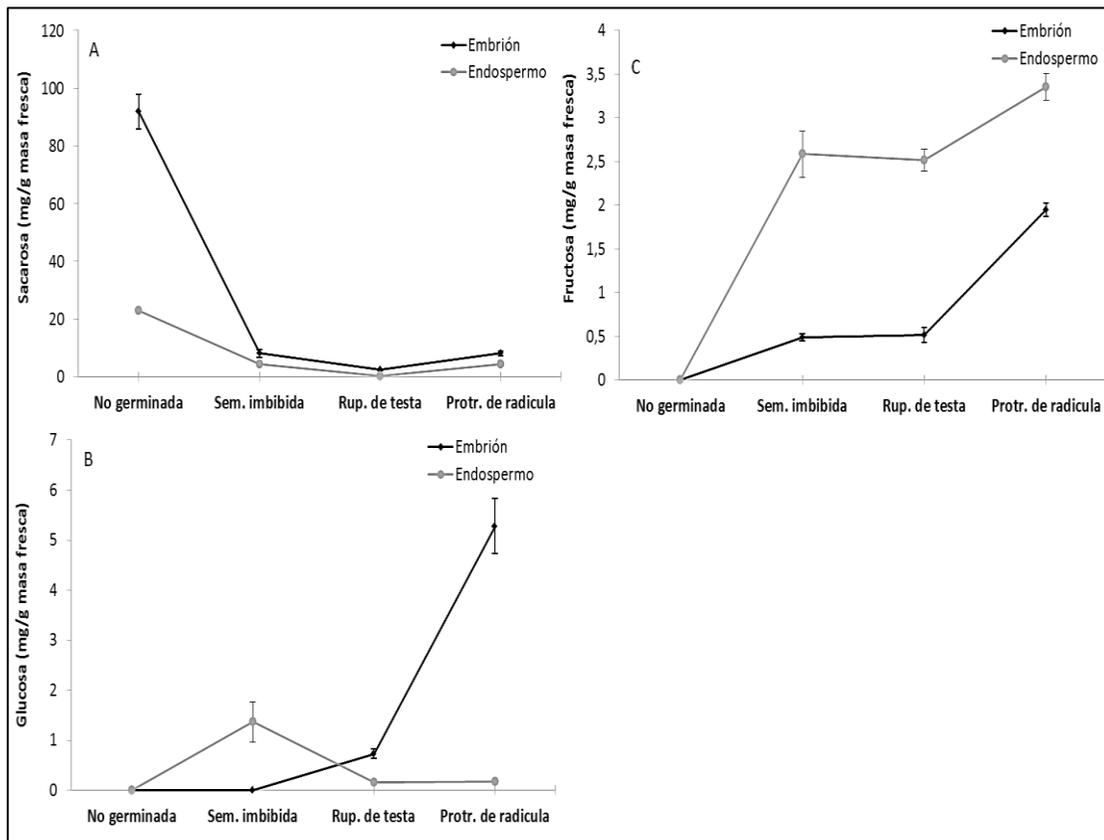


Figura 2-7. Cambios en la concentración (ug/mg materia fresca) de sacarosa (A), Glucosa (B) y Fructosa (C) en embrión y endospermo de semillas de *A. squamosa* L.en: semillas sin germinar (No germinada); imbibición por 72 horas (sem. Imbibida); Etapa I de germinación: ruptura de testa (Rup. de testa); Etapa II de germinación: protrusión de radícula (Protr. de radícula); elongación de radícula > 3mm (Rad. < 3 mm) y elongación de radícula > 10mm (Rad. < 10 mm). Imbibición en agua por 72 horas y posterior incubación para germinación a 35°C y HR de 60% en turba húmeda. Barras verticales indican error estándar (\pm).

Con los resultados se puede inferir que el metabolismo de sacarosa es importante para la germinación pues este azúcar es una reserva de uso rápido para la generación de energía y promueve el crecimiento del embrión debido a que es absorbida y usada como sustrato para respiración y biosíntesis, (Xu *et al.*, 2010, Koops y Groeneveld, 1990; Buckeridge *et al.*, 2004b, Hawker, 1985). También tiene funciones como una importante molécula señalizadora en la regulación de la germinación y el desarrollo del embrión y la plántula (Xu *et al.*, 2010).

En otras especies se han reportado comportamientos similares de los contenidos de sacarosa durante germinación. En embriones de maíz el contenido de la sacarosa disminuyó rápidamente en el primer día de germinación tras el proceso de imbibición y permaneció bajo durante los 5 días de estudio. En el endospermo los niveles de sacarosa disminuyeron dramáticamente después de la iniciación de la germinación a un

nivel indetectable y los niveles de glucosa fueron bajos durante todos los primeros 8 días de germinación (He y Burris, 1992). Scofield *et al.* (2007), encontraron en semillas de arroz altos niveles de sacarosa en el embrión cuando las semillas fueron imbibidas (1 día post-imbibición) y presentaron la tendencia a declinar gradualmente cuando se produjo la protrusión de la radícula. En el endospermo los niveles fueron mucho menores que en el embrión después de 1 dpi y protrusión de la radícula. En *Ricinus communis* la sacarosa es el azúcar que se transporta desde el endospermo y su hidrólisis ocurre subsecuentemente en tejidos a los cuales la sacarosa es transportada (Suda y Giorgini, 2000). En *Brassica napus* la germinación y desarrollo de la plántula fue regulada por sacarosa (Xu *et al.*, 2010).

En general, en el embrión y endospermo, la glucosa y fructosa presentaron valores de concentración mucho más bajos que los de sacarosa. En el endospermo después de la imbibición, la concentración de estas dos hexosas se incrementó, mientras que la concentración de sacarosa decreció. Este fenómeno puede deberse a la movilización e hidrólisis de polisacáridos durante la germinación. Los polisacáridos pueden ser hidrolizados por amilasas las cuales pueden ser responsables del incremento de los niveles de azúcares reductores en cotiledones durante los estados iniciales de germinación (Bemfeld, 1962). Sin embargo, es altamente posible que el incremento en estas hexosas se deba a la acción de enzimas que metabolizan sacarosa, las cuales hacen disponible el sustrato desde el endospermo hacia el eje embrionario durante la germinación (Bhattacharwa y Sen-Mondi, 1985). Ante esto numerosos autores han reportado correlaciones entre la germinación y las actividades de las enzimas que metabolizan sacarosa llamadas invertasas (1,3-fructofuranosidasa) y sacarosa sintasa (UDP-glucosa: 0-fructosa 2 glucosiltransferasa), las cuales son esenciales para el crecimiento debido a que hacen disponible azúcares requeridos para la expansión celular (Kaufman *et al.*, 1973; ApRees, 1974). La sacarosa sintasa requiere UDP como co-sustrato para producir fructosa y UDP- glucosa, mientras que la invertasa simplemente divide la sacarosa en glucosa y fructosa (Copeland, 1990). Se ha demostrado que la alta actividad de la invertasa está asociada con la actividad de tejidos en crecimiento, tal como embriones en expansión (Masuda y Sugawara, 1980; Faye y Ghorbel, 1983; Krishnan *et al.*, 1985).

Resultados similares se encontraron en arroz en donde los niveles de glucosa y fructosa fueron mucho más bajos que los de sacarosa tanto en embrión como en endospermo. En embrión, ambos azúcares incrementaron sustancialmente su concentración cuando las semillas fueron imbibidas 24 horas y cuando se produjo la protrusión de la radícula (Scofield *et al.*, 2007). En semillas de *Euphorbia heterophylla* los azúcares reductores mostraron un incremento rápido después de 48 horas y disminuyeron drásticamente después de las 72 horas (Suda y giorgini, 2000). Satyanarayana *et al.* (2011) encontraron en semillas de *Sterculia urens* Roxb que los niveles de azúcares reductores se incrementaron desde el día 0 hasta el día 6 de germinación en 1,90 mg/g hasta 2,86 mg/g y posteriormente se observó una tendencia inversa. Resultados concordantes fueron reportados por Khetarpaul y Chauhan (1990) en *Pennisetum glaucum*.

En la primera y segunda etapa de germinación de *A. squamosa* L, esto es, ruptura de testa y protrusión de radícula (ruptura de endospermo), se aprecia una posible movilización de glucosa, desde el endospermo al embrión. Es posible que durante el proceso de ruptura del endospermo y protrusión de la radícula la glucosa producida en el endospermo se mueva al embrión y allí, por acción de la sacarosa fosfato sintasa sea convertida en sacarosa, forma en la que puede ser transportado a tejidos en crecimiento del embrión (Scofield *et al.*, 2007).

Este incremento de glucosa en la ruptura de testa y protrusión de radícula se debe a que la presencia de esta hexosa no solo incrementa la longitud de la radícula, el número de raíces laterales y pelos radicales sino también la respuesta gravitrópica de las raíces primarias en plántulas, a través del efecto sobre inducción o supresión de genes que regulan AIA. La glucosa puede afectar casi todos los aspectos metabólicos de biosíntesis, transporte, percepción y señalización de auxinas para de esta forma modular ampliamente el crecimiento y desarrollo vegetal (Mishra *et al.* 2009)

Cambios en el contenido de proteína

En semillas sin germinar el contenido de proteína fue de 10,64 mg/g de tejido fresco y disminuyó levemente hasta 9,70 mg/g de tejido después de 72 horas de imbibición. La disminución más drástica se presentó en la ruptura de la testa en donde se alcanzó un valor de 5,59 mg/g de tejido. Posteriormente, en el proceso de ruptura del endospermo y protrusión de la radícula el contenido de proteína se incrementa hasta llegar a 12,33 mg/g (Figura 2-8).

Los resultados sugieren que hay un proceso de degradación proteica con el proceso de imbibición y en la primera etapa de germinación de *A. squamosa* L. En semillas maduras hay presentes RNA mensajeros, los cuales están asociados con los procesos de desarrollo y codifican proteínas que son importantes en la maduración y tolerancia a la desecación tales como proteínas LEA (Harris y Chrispeels, 1975; Harris *et al.*, 1975; Davies y Chapman, 1981; Asghar y DeMason, 1990; Dias *et al.*, 1993, Comai y Harada,1990; Lane, 1991), las cuales pueden ser degradadas rápidamente en la imbibición y en la germinación temprana (Jiang y Kermode, 1994; Han *et al.*, 1996) para generar péptidos solubles y posteriormente (por la acción de hidrolasas) aminoácidos libres. Estos aminoácidos libres son transportados hacia el eje embrionario con el objeto de soportar su crecimiento y como un recurso de energía (Shutov y Vaintraub 1987; Bewley y Black 1994; Muntz *et al.*, 2001). La degradación de proteínas se da principalmente en tejidos de almacenamiento seminal por proteasas las cuales son sintetizadas durante la maduración de la semilla para luego ser almacenadas y activadas en la germinación (Callis, 1995), o son sintetizadas *de novo* durante la germinación (Rogers *et al.*, 1985; Mitsuhashi y Minamikawa, 1989; Cervantes *et al.*, 1994).

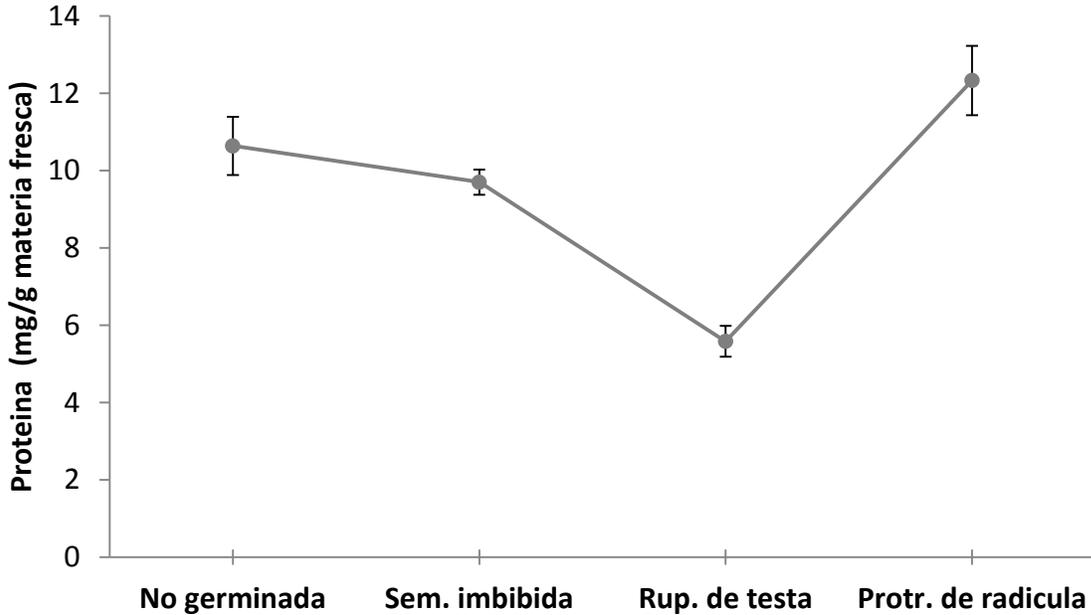


Figura 2-8. Cambios en los contenidos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ materia fresca) de proteína en semillas de *A. squamosa* L. en: semillas sin germinar (No germinada); imbibición por 72 horas (sem. Imbibida); Etapa I de germinación: ruptura de testa (Rup. de testa); Etapa II de germinación: protrusión de radícula (Protr. de radícula). Imbibición en agua por 72 horas y posterior incubación para germinación a 35°C y HR de 60% en turba húmeda. Barras verticales indican error estándar (\pm); $n=4$.

El incremento de los contenidos de proteína en la segunda etapa de germinación de las semillas de *A. squamosa* L. podría explicarse por el uso de aminoácidos libres para síntesis de enzimas y proteínas necesarias que se lleva a cabo en los embriones para soportar la extensión del eje embrionario (Bewley y Black, 1994). Nuevos mRNA son transcritos a medida que avanza el proceso de germinación. La mayoría de estos codifican proteínas esenciales para promover el normal metabolismo celular y reacciones para el mantenimiento del crecimiento en la germinación (Bewley y Marcus, 1990). Se han encontrado proteínas exclusivas de la germinación por lo que hay muchos mRNA llamados “exclusivos de germinación” reportados en la literatura, que codifican enzimas integrales para la movilización y conversión de reservas almacenadas. Estos son eventos postgerminativos importantes durante el crecimiento de la radícula y la plántula.

Resultados similares a los reportados aquí fueron encontrados por Satyanarayana *et al.* (2011) en *Sterculia urens*. En este caso, las semillas perdieron proteína levemente durante los primeros 3 días de germinación y posteriormente una pérdida rápida durante los días 6 y 15 coincidiendo con la extensión del hipocotilo. Por su parte Yoshida *et al.* (1997) encontraron resultados similares en cotiledones de *Vigna mungo*. Una considerable disminución de proteína en etapas tempranas de germinación fue observada en semillas germinadas de *Lupinus luteus* y *L. angustifolius* (Olczak *et al.*,

1992), soya (Tan-Wilson *et al.*, 1996), *Voandzeia subterranea* L. Thouans (Obizaba y Egbuna, 1992), *Telfairia occidentalis* Hook (Giami *et al.*, 1999) y *Helianthus annuus* (Balasaraswathi y Sadasivam, 1997). La movilización de proteínas almacenadas fue observada en semillas de *Pisum sativum*, *Glycine max*, *Vicia sativa* y *Phaseolus vulgaris* (Schlereth *et al.*, 2000; Tiedemnn *et al.*, 2001).

Actividad peroxidasa durante la germinación

Las más baja actividad peroxidasa se observó con la ruptura de la testa (0,00494 Δ A460/ Δ min*mg prot) y la protrusión de la radícula (0,00340 Δ A460/ Δ min*mg prot). En las semillas imbibidas por 72 horas se observó alta actividad enzimática (0,04550 Δ A460/ Δ min*mg prot) la cual fue 9 y 13 veces mayor que la encontrada en las semillas con ruptura de testa y protrusión de radícula, respectivamente (Figura 2-9). En las semillas sin germinar, también se evidenció baja actividad (0,00959 Δ A460/ Δ min*mg prot), aunque mayor que la presentada en las dos etapas de germinación evaluadas, lo cual puede significar que esta enzima se encuentra en baja concentración o no activa cuando la semilla está seca.

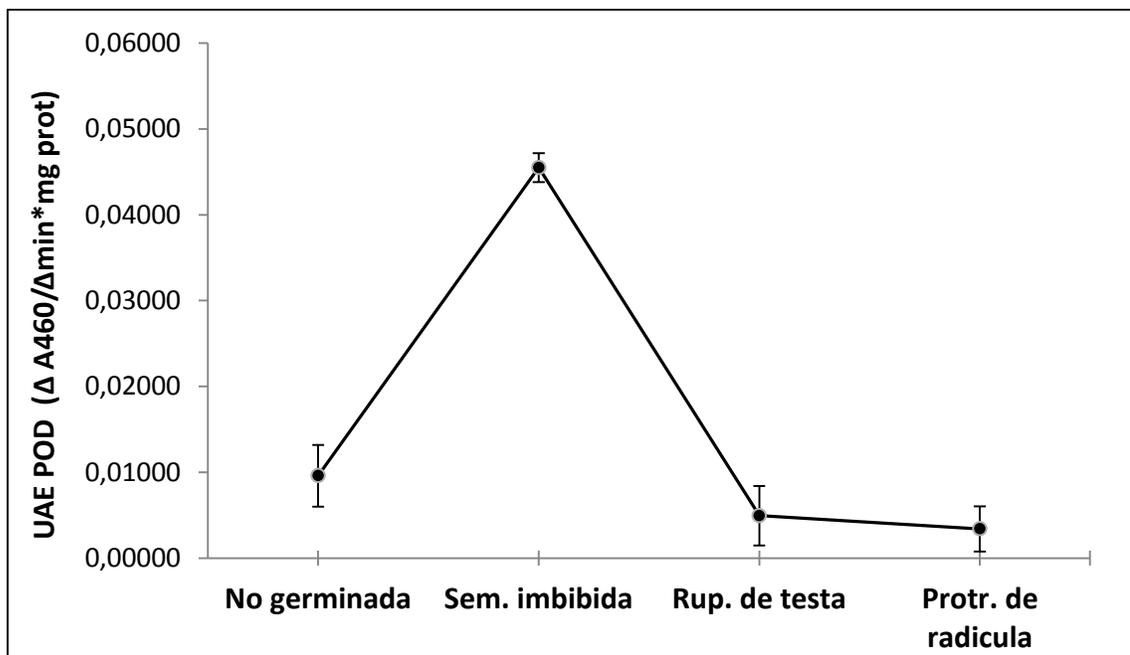


Figura 2-9. Cambios en la actividad enzimática peroxidasa (Δ A460/ Δ min*mg prot.) en semillas de *A. squamosa* L. en: semillas sin germinar (*No germinada*); imbibición por 72 horas (*sem. Imbibida*); Etapa I de germinación: ruptura de testa (*Rup. de testa*); Etapa II de germinación: protrusión de radícula (*Protr. de radícula*). Imbibición en agua por 72 horas y posterior incubación para germinación a 35°C y HR de 60% en turba húmeda. Barras verticales indican error estándar (\pm); n=4.

La baja actividad enzimática peroxidasa encontrada durante la ruptura de la testa y protrusión de la radícula puede deberse a que en estas etapas se requieren incrementos

de ROS para mejorar la capacidad de germinación de las semillas (Schopfer *et al.*, 2001). El H₂O₂ promueve el catabolismo oxidativo de ABA, contribuye con el rompimiento de latencia y promueve la germinación (Wang *et al.* 1998; Fontaine *et al.*, 1994; Zeinalabedini *et al.*, 2009). En semillas de girasol (Oracz *et al.*, 2007) y *Arabidopsis* (Job *et al.*, 2005) las ROS elicitán respuestas de crecimiento relacionadas con la ruptura de la testa y endospermo, y la oxidación de proteínas por el H₂O₂ está asociada a la pérdida de latencia y germinación de semillas.

Adicionalmente, el incremento observado por activación del sistema antioxidante en la rehidratación es reportado para contrarrestar los incrementos en los niveles de ROS. Luego de la imbibición se da una transición gradual de los componentes fosfolípidos de membrana del estado de gel (de semillas maduras y secas) al estado hidratado líquido cristalino. En esta transición el incremento en la toma de oxígeno, la fosforilación oxidativa y la movilización de recursos almacenados generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan daños estructurales y funcionales en las células (Prodanovic *et al.*, 2007), muerte celular (Kranner *et al.*, 2006), y daño de macromoléculas (Moller *et al.*, 2007). Diferentes autores reportan que la imbibición y la activación metabólica son un fuerte estrés para la semilla (Bewley, 1997a; Bailly, 2004; Kranner y Birtic, 2005). Así mismo De gara *et al.* (1997) y Tommasi *et al.* (2001) argumentan para otras enzimas del sistema antioxidante que un rápido incremento en los contenidos de la actividad ascorbato peroxidasa durante los primeros estados de germinación es una estrategia común desarrollada por las semillas para contrarrestar los incrementos en los niveles de ROS.

Resultados similares a los encontrados en el presente trabajo fueron reportados por Morohashi, (2002), quien encontró que la actividad peroxidasa en el endospermo micropilar y lateral alcanzó el valor máximo a los 72 horas de imbibición. Prodanovic *et al.* (2007), compararon la actividad específica peroxidasa durante la germinación de semillas en dos líneas (A y C) de *Picea omorika*. Los resultados mostraron que en la línea A la actividad específica de POD por peso fresco se incrementó continuamente a partir del día 4 y fue la más alta en el día 7 de imbibición, y que las semillas secas no mostraron actividad POD. En semillas de tabaco y *Lepidium sativum* se detectó un pico en la actividad peroxidasa a las 2 horas de imbibición (Linkies *et al.*, 2010). En semillas de trigo un rápido incremento en el contenido de ascorbato y actividad APX durante los primeros estados de germinación han sido demostrados por autores como Cakmak *et al.*, 1993 y De Gara *et al.*, 1997.

3. Caracterización del fenómeno de latencia en semillas de anón (*Annona squamosa* L.) (Annonaceae) mediante la aplicación de diferentes tratamientos pregerminativos

La familia Annonaceae incluye aproximadamente 50 géneros. Tres géneros (*Almona*, *Rollinia* y *Asimina*) producen frutos comestibles (George y Nissen, 1993). Dos géneros son de importancia comercial; *Annona*, que comprende unas 100 especies, y *Rollinia*, que incluye cerca de 50 especies (George, 1985). Las principales especies comerciales son la chirimoya (*Annona cherimola* Mill.), el híbrido atemoya (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.), el anón (*Annona squamosa* L.) y la guanábana (*Annona muricata* L.). La chirimoya es nativa de las tierras altas subtropicales de Perú y Ecuador, y se cultiva comercialmente en Chile, España, California y Nueva Zelanda (George y Nissen, 1993). La Atemoya es un híbrido y al parecer un intermedio en las características morfológicas y necesidades climáticas de sus padres. Se cultiva comercialmente en Florida (USA) y Australia (George y Nissen, 1987). La guanábana se distribuye en regiones tropicales de América Central y este de India (Popenoe, 1974).

El anón es la especie más ampliamente distribuida del género *Annona* en el mundo. Se cultiva en la zona tropical de Suramérica, en el sur de México, el occidente de la India, Bahamas, Bermudas, y en el sur de la Florida. Igualmente, en las zonas cálidas tropicales de América, Jamaica, Puerto Rico, Barbados, el sur de la India y en las regiones secas del norte de Queensland, Australia, se encuentra en forma silvestre en praderas y bosques (Rajput, 1985; Morton, 1987; Hoyos, 1989). El cultivo es extenso en India, mientras que en Brasil es uno de los frutos más importantes, siendo llamativo en los mercados de Bahía. En Colombia, se encuentra en la Costa Atlántica y en las zonas secas de los valles interandinos, en los departamentos de Valle, Caldas, Huila, Tolima, Cundinamarca, Meta y los Santanderes, entre los 450 y 1.500 msnm (Loteró, 1976). A pesar de que aún no se exporta oficialmente Anón, la opinión de expertos en frutas promisorias, lo clasifican como fruto de alto potencial de mercado en el exterior. En el mercado nacional, el anón es de alta demanda y alto precio, bordeando los \$4.000 por kg. Esto explica el amplio margen de intervención en prácticas adecuadas de mercadeo, lo cual, permite mejorar significativamente el precio al productor. Por otro lado, el anón presenta posibilidades reales en el mercado internacional, prueba de ello es el interés de la Corporación Colombia Internacional y exportadoras como "El Tesoro Fruit", quien ha

enviado las primeras muestras a Alemania (Material de Siembra y Mejoramiento Genético del Anón (*Annona squamosa* L., 2011).

Existe una gran variabilidad genética dentro de esta especie aunque se han desarrollado pocas variedades de importancia comercial. Quizá el 'Seedless Cuban' sea el cultivar más importante, el cual fue desarrollado en Cuba e introducido a la Florida en 1955. Presenta frutos ligeramente malformados, de tamaño medio y con vestigios de semillas no desarrolladas. El sabor es menos atractivo que el de los frutos normales pero es propagado vegetativamente y distribuido como una novedad. Existe otro cultivar cubano que tiene bajo contenido de fibra (Nakasone y Paull, 1998). Morton (1987), afirma que horticultores hindúes estudiaron la diversidad de anones silvestres y cultivados en diferentes países y reconocieron once tipos: "Red" (*A. squamosa* var. Sangareddyiz), "Red-speckled", "Crimson", "Yellow", "White-stemmed", "Mammoth" (*A. squamosa* var. Mammoth), "Balangar", "Kakarlapahad", "Washington", "Barbados" y "British Guiana". Otros cultivares crecen en la Estación Experimental Sabahia, en Egipto: "Beni Mazar", "Abd El Razik". Se han hecho cruces interespecíficos con el fin de determinar la compatibilidad que existe entre anonáceas y hasta el momento, la atemoya (*A. squamosa* x *A. cherimola*) es el único híbrido desarrollado con importancia comercial (Nakasone y Paull, 1998).

La reproducción sexual es el método tradicional a través del cual el anón se ha venido propagando y es el más utilizado por los productores en el municipio de Apulo (Guerrero, 2005). La siembra por semilla debe hacerse en forma horizontal, a 2 cm de profundidad y a una distancia de 1,5 cm. La germinación se inicia a partir de 30 días (Cruz, 2002). Este método tiene varias desventajas como baja germinación, alta variabilidad genética (Morton, 1987; Cruz, 2002). Las semillas pierden rápidamente su viabilidad (aproximadamente en 6 meses); razón por la cual estas deben ser sembradas tan pronto como sea posible (Nakasone y Paull, 1998). Lo anteriormente expuesto está de acuerdo con George y Nissen, (1987b) quienes señalan que la mayoría de las semillas tropicales de Anonaceae tienen un período relativamente largo de viabilidad, requiriendo de 1 a 3 meses para germinar, sin embargo pero poseen una pobre e impredecible germinación la cual es altamente variable (en un rango del 30 al 80 %) en semillas recién cosechadas.

Los frutales perennes son plantas silvestres a cultivadas con un síndrome de domesticación incompleto (Gepts, 2002). Con base en esto es posible inferir que las semillas exhiben algún tipo de latencia, la cual es una obstrucción al proceso de germinación de las semillas viables, bajo condiciones favorables (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Las especies se han adaptado diferencialmente a las condiciones prevalentes del ambiente, llevando a cabo la germinación para el establecimiento de una nueva generación de plantas, cuando las condiciones son apropiadas para la supervivencia (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Fenner y Thompson, 2005; Baskin y Baskin, 2004). Esto constituye una estrategia evolutiva de las especies para evitar que las semillas germienden en ambientes que puedan amenazar la supervivencia de las plántulas (Ellis *et al.*, 1985a; Schmidt, 2000). Las semillas pueden

entrar en latencia mientras se encuentran en la planta madre (latencia primaria) o desarrollarla después de la dispersión debido a las condiciones ambientales (latencia secundaria). La latencia también puede ser clasificada en exógena, endógena o doble. La latencia exógena depende de factores externos al embrión. Esto incluye tejidos maternos en la semilla o fruto (como la testa o el pericarpio) que crean una barrera para la germinación. Este tipo de latencia se divide en latencia física (testa impermeable), mecánica (las cubiertas de la semilla restringen el crecimiento de la radícula) y química (inhibidores en la cubierta seminal). La latencia endógena es impuesta por factores a nivel embrional y puede ser dividida en morfológica (embrión sin desarrollar) y fisiológica (factores internos del embrión). La latencia doble es una combinación de diferentes clases de latencia, mientras la latencia secundaria ocurre cuando las condiciones ambientales inducen latencia en semillas (Hartmann *et al.*, 1997).

Otros autores han indicado que la ausencia de germinación no siempre tiene que ver con un fenómeno de latencia y que más bien está asociada con atributos de la semilla, que determinan las condiciones requeridas para que proceda la emergencia del embrión (Fenner y Thompson, 2005; Thompson, 2000). La latencia y la germinación están determinadas por la interacción entre el potencial de crecimiento del embrión y las limitaciones dadas por los tejidos que lo rodean (Koornneef *et al.* 2002)

En los taxa cultivados de *Annona*, autores como Pinto, 2005b; Padilla y Encina, 2003 han indicado problemas en la propagación sexual debida a la germinación irregular lo cual es debida a diferentes niveles de latencia (Ferreira *et al.*, 1999; Moreno *et al.*, 1999; Pinto, 1975; Lobo *et al.*, 2007), atribuidas (en gran variedad de trabajos), al grado de madurez de la semilla, la cual esta determinada por factores climáticos, en lugar de ser innata (Pinto, 2005a).

Con respecto a la anterior los géneros de Annonaceae *Cyathocalix*, *Rollinia* y *Annona* (*Annona squamosa* L. y *Annona crasiflora*) se ha reportado latencia morfológica y morfisiológica en taxa en los géneros *Goniothalamus*, *Mitrephora*, *Monocarpia*, *Paeaunthus*, *Polyanthia*, *Xylophia*, *Unonopsis* y *Annona*, *Annona coriaceae* y *Annona spraguei* (Baskin y Baskin, 2001). Tambien se ha reportado latencia fisiológica y embriones inmaduros en *Annona crasiflora* (Da Silva *et al.*, 2007).

En la latencia morfológica se presentan embriones rudimentarios y laminares ocupando un 1% del volumen de la semilla, siendo la mayor parte ocupada por el endospermo (semillas endospermicas) (Nikolaeva, 1969). Los embriones no presentan latencia, sin embargo no presentan diferenciación y solo necesitan tiempo para crecer y germinar (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). La latencia morfofisiologica se caracteriza por presentar además de un embrión rudimentario, un mecanismo fisiológico inhibe la germinación de la semilla (Baskin y Baskin, 2001; Baskin y Baskin, 2004). Para superar este tipo de latencia se requieren proceso de estratificación, los que, en algunos casos,

pueden remplazarse por aplicación de ácido giberélico, GA₃, (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

Para superar la latencia, existen algunos tratamientos que se efectúan antes de la germinación, por lo que son denominados tratamientos pregerminativos: La estratificación, permite superar la latencia proveniente de un embrión inmaduro que es incapaz de germinar con normalidad (Baskin y Baskin 2001), debido a que promueve el incremento transitorio de la concentración de Giberelinas y citoquininas en las semillas (Solís, 2006). El aumento de las Giberelinas endógenas, como resultado de la estratificación, estimula la germinación de semillas sin la aplicación directa de la misma y además se ha reportado que favorece la reducción de ácido abscísico (ABA) (Bewley y Black, 1994). La estratificación puede ser cálida (si se lleva a cabo a temperaturas entre 22 y 30°C) o puede ser fría (si se lleva a cabo a temperaturas entre los 0 y 8 °C) y consiste en colocar las semillas en un sustrato húmedo durante un período de tiempo que sea adecuado para la especie (Baskin *et al.*, 2002). La escarificación es otro tratamiento pregerminativo, incluye cualquier proceso que rompa, raye o ablande la testa o cubierta seminal para hacerlas permeables al agua o a los gases: puede ser mecánica, donde las semillas son lijadas, cortadas, o punzadas, también puede ser con agua a temperaturas entre los 70 y 100 °C, o mediante escarificación química que incluye el uso de ácidos altamente concentrados, este tratamiento se emplea para semillas con latencia de cubierta (Fang *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha reportado que la escarificación y estratificación no mejoran la germinación de estas especies (Jubes *et al.*, 1975; Vargas, 1986), por el contrario se ha reportado que el ácido giberélico y las altas temperaturas muestran una mejora en la germinación de las semillas de chirimoya (Wunkshaus, 1990).

Específicamente en *Annona squamosa* L. se ha reportado latencia morfológica (Lobo *et al.*, 2007, Baskin y Baskin, 2001). Sin embargo, Stenzel *et al.* (2003), reportan que esta especie presenta sustancias inhibitoras de germinación que junto con el tegumento resistente e impermeable proporcionan factores antagónicos para una germinación rápida y uniforme. Por su parte, Lemos *et al.* (1988) indican la presencia de latencia física lo cual ha sido refutado por otros autores. Ferreira y colaboradores (1997, 1998, 1999, 2002 y 2005), Colauto y colaboradores (2003) y otros autores han aportado valiosa información referida a tratamientos pregerminativos con giberelinas que en efecto presentan grandes mejoras en el potencial germinativo de la especie. Con relación al fenómeno de latencia en *A. squamosa* L. hay en general pocos reportes y los existentes presentan discordancias. Adicionalmente las investigaciones del efecto de tratamientos y del fenómeno de latencia hechas por la mayoría de autores no aportan información suficiente que permita una comprensión más profunda de los procesos de germinación y latencia presentes en las semillas de anón. Por lo anteriormente expuesto, la presente investigación pretende determinar la temperatura óptima de germinación y caracterizar el fenómeno de latencia en semillas de *Annona squamosa* L mediante la aplicación de diferentes tratamientos pregerminativos. Esto con el propósito de contribuir a la caracterización, la protección y conservación de la especie y mejorar los procesos de

multiplicación de materiales para actividades de investigación, transferencia y producción comercial de semilla.

3.1 Metodología

Esta investigación fue realizada en el laboratorio de Fisiología Vegetal y en el laboratorio de Recursos Genéticos, de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.

Selección de material vegetal

El material seleccionado se obtuvo de las accesiones colectadas para el desarrollo del proyecto del Banco Colombiano de Germoplasma de Anón que hace parte del programa: Material de Siembra y Mejoramiento Genético del Anón (*Annona squamosa* L.). Durante el desarrollo del proyecto se realizaron expediciones de colecta de material en todo el país. La selección de los materiales a emplear en el estudio se realizó buscando accesiones contrastantes, basado en los valores de descriptores de caracterización morfo - agronómica tomados en campo y en laboratorio, así como a la tradición en la producción de la especie. De todas las zonas visitadas se seleccionaron las accesiones colectadas el municipio de Apúlo, Cundinamarca y Castilla, (Coyaima) Tolima debido a que los individuos se encuentran distribuidos en agroecosistemas y no en solares o de forma espontánea en jardines. En particular se destaca la potencialidad frutícola del municipio de Apulo como principal productor nacional (Centre for Underutilised Crops, 2005) de anón, lo cual se debe a la calidad intrínseca que alcanza el fruto (alto contenido de azúcares) en el ecosistema bosque seco tropical. Así mismo las dos zonas presentan una amplia diferencia a nivel ambiental. Apulo presenta una menor temperatura, brillo solar y precipitación durante todo el año en comparación con Castilla, Coyaima, lo cual supone diferencias a nivel morfoagronómico (Tabla 3-1).

Variable	Altura (m.s.n.m)		Castilla	447	Apulo	635
	Enero		Febrero		Marzo	
Semestre I	Castilla	Apulo	Castilla	Apulo	Castilla	Apulo
Temperatura (°C)	28.20	24.40	28.20	24.84	28.20	25.13
humedad (%)	72.2	91.00	71.5	80.67	73.2	85.00
Brillo solar (horas)	216.1	170.6	166.0	130.8	161.1	95.8
precipitación (mm)	157.36	68.12	135.81	101.89	208.08	144.32
Semestre I	Abril		Mayo		Junio	
Temperatura (°C)	27.70	24.76	27.60	24.43	28.30	24.34
humedad (%)	75.9	83.67	74.9	90.00	67.4	90.00
Brillo solar (horas)	159.2	103.0	170.9	70.9	176.0	114.4
precipitación (mm)	260.19	119.00	176.80	114.58	80.97	66.75
Semestre II	Julio		Agosto		Septiembre	
Temperatura (°C)	29.20	25.01	30.00	25.77	29.20	25.14
humedad (%)	59.3	87.00	55.3	93.00	60.6	85.50
Brillo solar (horas)	184.7	119.5	199.5	157.5	184.9	124.1
precipitación (mm)	26.25	38.29	48.83	42.50	158.05	84.90
Semestre II	Octubre		Noviembre		Diciembre	
Temperatura (°C)	27.60	24.35	27.10	24.08	27.30	24.41
humedad (%)	70.0	87.50	77.6	87.67	72.1	85.33
Brillo solar (horas)	193.5	128.3	182.8	105.5	204.1	105.6
precipitación (mm)	274.79	144.88	333.27	134.38	204.51	86.26

Tabla 3-1. Variables climáticas de las zonas de colecta, Apulo (Cundinamarca) y Castilla (Tolima). Tolima: estaciones Jabalcón (Municipio Saldaña) y Anchique (Municipio de Natagaima), Media Luna (Coyaima). Cundinamarca: estación Samper Madrid (Apulo). Fuente: Corporación autónoma regional de Cundinamarca (2000) y PBOT Plan Básico De Ordenamiento Territorial – Coyaima (2000).

Las accesiones seleccionadas (Tabla 3-2) presentaron similitudes en cuanto a descriptores como altura del árbol, diámetro, altura de copa y forma del árbol y grandes diferencias en variables de fruto (Figura 3-1). En general las accesiones provenientes de Apulo tienen en promedio frutos con mayores pesos, diámetros y un mayor porcentaje de pulpa, exocarpos de menor grosor. Así mismo son frutos con un mayor contenido de SST (°Brix) y un mayor número y peso de semillas.

Tabla 3-2. Descriptores de pasaporte de las accesiones de *Annona squamosa* L. Seleccionadas.

ID	Depto	Mpio	Lat	Latitud	Long	Long	Lat	Long	msnm
T7AS180	Tolima	Castilla	N	3 48 11.3	W	75 04 13.0	912372	889722	341
T7AS181	Tolima	Castilla	N	3 48 11.5	W	75 04 12.8	912378	889728	341
C2AS224	Cund.	Apulo	N	4 30 25.1	W	74 35 06.8	943652	990152	670
C2AS225	Cund.	Apulo	N	4 30 24.9	W	74 35 06.7	943656	990147	674
C2AS226	Cund.	Apulo	N	4 30 24.5	W	74 35 06.4	943665	990135	676

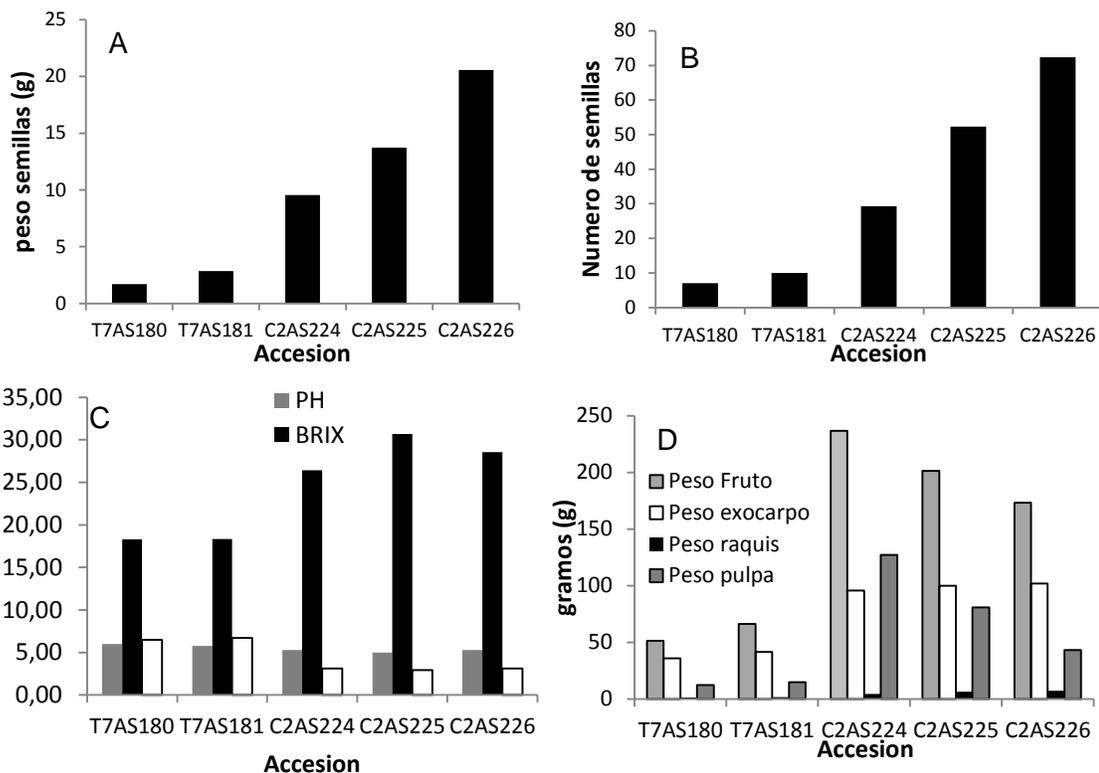


Figura 3-1. Descriptores de fruto para las accesiones de *Annona squamosa* L. seleccionadas. A y B. Peso y número de semillas; C. pH, °BRIX y Acidez titulable y D. peso fresco de fruto, exocarpo, ráquis y pulpa.

Obtención de semillas y manejo del sustrato

Las semillas se obtuvieron a partir de frutos maduros y blandos al tacto, se lavaron con agua a temperatura ambiente para remover hongos tierra o cualquier residuo presente en su superficie. Luego se separó la corteza (pericarpio) de la pulpa (mesocarpio) y se retiró manualmente la semilla de la pulpa y el arilo; posteriormente se lavaron y se colocaron en toallas de papel absorbente durante tres días a temperatura ambiente con el fin de secarlas. Las semillas se desinfectaron con inmersión en Hipoclorito al 1% durante 9 minutos, lavado con agua destilada y etanol al 96%, finalmente, se realizó una limpieza con agua destilada para retirar en etanol que pudiera quedar en la semilla.

El sustrato de germinación fue turba rubia (Klassmann[®]), Con el fin de evitar la presencia de hongos o bacterias se desinfectó tanto la turba como las semillas usadas en el desarrollo del ensayo. La desinfección de la turba se realizó con Benomyl (1 g/L) y Vitavax (2 g/L).

Viabilidad de las semillas

Para determinar la viabilidad de los embriones, se utilizó, la metodología de tinción con tetrazolio, establecida por la Asociación Internacional de Chequeo de las Semillas (ISTA, 1995) para lo cual antes de la aplicación del protocolo se evaluaron diferentes tipos de corte: longitudinal ventral, longitudinal dorsal y transversal micropilar (región cercana al embrión), transversal apical, remoción de testa y embrión solitario. El ensayo se dispuso en tres repeticiones, cada repetición constó de una caja de petri con 25 semillas. La prueba se llevó a cabo en oscuridad, durante un periodo de 24 horas, a 32°C, 60% de humedad relativa y en una concentración del 1% de tetrazolio preparado en agua a 30°C. Se realizó un registro fotográfico de las diferentes tinciones. El cloruro de tetrazolio se reduce a trifenilformazan, una sustancia estable de color rojo intenso que genera coloración solo en tejidos embrionarios viables. Esta sustancia interactúa con los procesos de oxidación y reducción de las células vivas de la semilla. Una vez que los diferentes tejidos de las semillas se han hidratado, en el embrión se activan enzimas de la ruta metabólica de la respiración que reducen esta sustancia química generando el cambio de color; en el caso de las semillas no viables, donde no se activan las reacciones oxidativas, no se observa coloración (Pérez-García y Pita, 2001); lo anterior permite distinguir las partes vivas, con coloración roja en la semilla, de las muertas, que no exhiben tinción (Poulsen *et al.*, 2006). El procedimiento es útil para distinguir entre semillas vivas y latentes ya que en las *Annonaceae* hay problemas de polinización que pueden conducir a la presencia de simientes sin embrión (Lobo *et al.*, 2007).

Curva de secado

Para las semillas de las dos localidades, se evaluó la pérdida de humedad en los tiempos 0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas. Las semillas fueron puestas en envases plásticos abiertos, los cuales en su base contenían bolsas con sílica gel color azul oscuro, en una relación de pesos 1:1. Se estableció un diseño al azar con tres repeticiones, siendo los tiempos los tratamientos evaluados, cada repetición constaba de 50 semillas. Los envases con las semillas fueron puestas en una cámara de secado hermética, a la cual se le ajustó la temperatura a 18,2 °C y HR de 19,3%. En cada tiempo de germinación se determinó el porcentaje de humedad con el método modificado de alta temperatura constante en horno a 133 °C por dos horas.

Temperatura de germinación

Se evaluó la germinación de semillas de *A. squamosa* L. provenientes de las accesiones seleccionadas en cuatro regímenes de temperatura: 30 °C, 30/20 °C (12 horas), 35 °C y temperatura ambiente (media: 18,7; máxima: 22,9; mínima: 17,3) para la cual las semillas fueron puestas en bandejas, con turba sin nutrientes como sustrato, a una profundidad equivalente al doble de su longitud y luego puestas en un fitotrón Conviron CMP3244, con el régimen de temperatura requerido, humedad relativa de 60% y en ausencia total de luz ya que las semillas de *Annona squamosa* L. son indiferentes a las condiciones de luz (Ferreira *et al.*, 1997). Se estableció un diseño factorial completamente al azar con 5 repeticiones por tratamiento. Se determinó la humedad y viabilidad de las semillas antes de establecer el ensayo, estas presentaron humedades entre el 9,5 y el 10,2 % y porcentajes de viabilidad de 78%, 86% y 82%. Se realizaron observaciones cada 5 días

durante 30 días, ya que las semillas que germinan después de este periodo pueden considerarse latentes (Baskin y Baskin, 2001). Se registraron como semillas germinadas aquellas en las que hubo protrusión de la radícula y esta fue mayor a 3 mm.

Curvas de imbibición

Para evaluar el efecto de testa y la temperatura sobre la absorción de agua, se realizaron curvas de imbibición empleando semillas de las accesiones seleccionadas, con 5% a 7% de humedad. Se evaluó el proceso de imbibición a tres temperaturas 30°C, 35°C y ambiente (media: 18,7; máxima: 22,9; mínima: 17,3) y el efecto de la eliminación de la testa. Los tratamientos, cada uno con 4 repeticiones, se distribuyeron en un diseño al azar así para las dos localidades: Sin testa – 35°C; sin testa – 30°C; sin testa – ambiente; con testa – 35 °C; con testa – 30°C y con testa - Ambiente. Se determinó la humedad inicial en un analizador de humedad OHAUS, posteriormente, se pesaron semillas sin imbibir lo que correspondió al tiempo 0. Las semillas se incluyeron en frascos tapados con agua destilada y se llevaron a sus respectivos ambientes. Se registraron pesos cada hora durante las primeras 12 horas, y a las 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 y 144 horas.

Tratamientos pregerminativos

Para determinar el efecto de escarificación mecánica sobre germinación de semillas de *A. squamosa* L. de las dos localidades, se evaluó la eliminación total de testa (ST) y tres tipos de eliminación parcial con lija y con cuchilla: lija distal (LD), corte apical distal (AD), corte apical proximal (AP) y corte ventral (CV).

Para evaluar el efecto del tratamiento con GA₃ sobre germinación, las semillas fueron sometidas a imbibición durante 72 horas en solo agua destilada (control, 0 mg/kg de GA₃) y en 6 diferentes concentraciones de GA₃: 50, 100 200, 400, 600 y 800 mg/kg, en frascos de vidrios tapados.

En la determinación del efecto de la estratificación caliente húmeda sobre las semillas de *A. squamosa* L. estas fueron puestas en bandejas con turba a capacidad de campo y puestas en una cámara a temperatura constante de 25°C, durante 15 (E 15), 30 (E 30) y 45 (E 45) días.

Los tratamientos de cada ensayo, junto con el control correspondiente, fueron dispuestos en un diseño completamente al azar con arreglo factorial, con 5 repeticiones por tratamiento, en bandejas con sustrato turba sin nutrientes a una profundidad equivalente al doble de su longitud y puestas en un fitotrón Conviron CMP3244, a temperatura constante de 35°C, humedad relativa de 60% y en ausencia total de luz, de acuerdo con Ferreira *et al.* (1997). Se realizaron observaciones cada 5 días durante 30 días, ya que las semillas que germinan después de este periodo pueden considerarse latentes (Baskin y Baskin, 2001). Se registraron como semillas germinadas aquellas en las que hubo protrusión de la radícula.

Análisis de datos

Con los datos del muestreo en el tiempo se calculó el porcentaje de germinación (PG), índice de sincronía (E), tiempo medio de germinación (TMG) y velocidad media de germinación (VMG) siguiendo las ecuaciones presentadas en la tabla 3-3.

Tabla 3-3 Formulas empleadas para el cálculo de variables de germinación. Tomado de Ranal y Santana (2006).

Variable	Ecuación	unidad
PG	$\left(\frac{N}{N_s} \right) * 100$	%
VMG	$\sum_{i=1}^k n_i / t_i$	Semillas germinadas / día
TMG	$\sum_{i=1}^k n_i t_i / \sum_{i=1}^k n_i$	días
E	$-\sum_{i=1}^k f_i \log_2 f_i$	Adimensional

n_i = número de semillas germinadas en la i ésima toma de datos

t_i = tiempo (en días) de la i ésima toma de datos

K = Tiempo (en días) de duración de la prueba de germinación

N = número de semillas germinadas

N_s = número de semillas totales

f_i = frecuencia relativa de germinación

Se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas con ayuda del paquete estadístico SAS, los datos que no presentaron normalidad en los residuales fueron transformados con la función $\sqrt{\text{PG}/100}$, usualmente utilizada en estudios de germinación (Wagner *et al.*, 2006). Se realizó un ANAVA y las diferencias entre los tratamientos se determinaron mediante prueba de Tukey ($P < 0,05$). Se usó el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System), versión 9.1,

Ajustes a modelos de regresión

La respuesta al secado se ajustó a los modelos logístico y al modelo polinómico de tercer grado.

La en respuesta, las curvas de imbibición y la respuesta del PG a la temperatura y a la aplicación de ácido giberélico, para ambas localidades fueron ajustados a un modelo logístico tal y como se define a continuación:

$$Y = \frac{K}{1 + B e^{(-At)}}$$

En donde K es el máximo valor que alcanza la variable, en este caso el peso de las semillas (g) o el porcentaje de germinación (%), A es el producto entre el valor inicial “a” por el máximo “ K ”, B es un parámetro de escala sobre el tiempo t que influencia la tasa de crecimiento.

En el caso de las curvas de imbibición y las respuestas del PG a la aplicación de ácido giberélico, sobre el modelo logístico fue calculado el punto de inflexión ($t = \frac{\ln B}{A}$, $y = \frac{K}{2}$) con el objeto de establecer el cambio en la concavidad de la curva para así determinar la dinámica de variación del crecimiento representado en el porcentaje de germinación o en el peso fresco. Esto tiene como fundamento el comportamiento del modelo logístico antes del punto de inflexión, en donde hay una alta variación de los datos. En este punto de la curva el ascenso de “ Y ” (porcentaje de germinación) llega a la mitad de su valor máximo “ K ” posible, posteriormente, a partir de este punto se inicia un crecimiento cada vez menor de modo que se va acercando asintóticamente a la ordenada $y = K$. Después del punto de inflexión la tasa de variación es cada vez menor (Espina, 1984).

3.2 Resultados

Determinación de viabilidad

En todos los cortes evaluados se presentó tinción en los tejidos expuestos. Sin embargo en el corte longitudinal dorsal (Figura 3-2 D) se observa una coloración del embrión mas uniforme e intensa, lo que indica que es este el mas apto para este tipo de determinaciones. En este corte se observa como la coloración del embrión es más intensa hacia la zona del ápice radicular que en los cotiledones. En embriones extraídos la tinción es también uniforme y más intensa en la región de la radícula (Figura 3-3). En semillas sin cubierta seminal (Figura 3-2 A), con corte transversal (Figura 3-2 B) y corte transversal ventral (Figura 3-2 C), la tinción del endospermo fue de forma irregular y no es posible apreciar claramente la tinción del embrión. Aunque la intensa coloración es un indicativo de viabilidad no se puede concluir si hay viabilidad de la semilla.



Figura 3-2. Cortes evaluados en la prueba de viabilidad de semillas de anón. A, semilla sin cubierta seminal. B, corte transversal. C, corte longitudinal ventral. D, corte longitudinal dorsal.

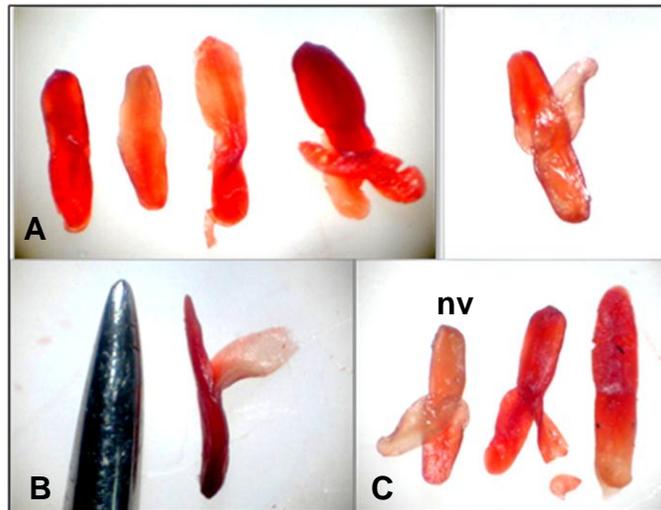


Figura 3-3. Patrones de tinción del embrión en la prueba de viabilidad de semillas de anón. A, embriones viables. B, tinción incompleta, embrión viable. C, comparación embrión viable y no viable. *nv* no viable.

Resultados similares fueron encontrados por Lobo *et al.*, (2007) en semillas de chirimoya y guanábana en donde la mejor tinción con tetrazolio, evaluada visualmente, se obtuvo con los cortes longitudinales dorsal y ventral, en comparación con las semillas a las cuales se les eliminó la testa y aquellas a las que se les practicó un corte transversal.

Curva de secado

Las curvas obtenidas son útiles para predecir el tiempo requerido para la obtención de una humedad determinada, a partir del contenido de inicial de ésta, de acuerdo con el procedimiento indicado por Rao *et al.* (2006). En la figura 3-4 se presentan las curvas de secado para las semillas de anón obtenidas en Apulo, Cundinamarca y Castilla, Tolima. Las semillas del Tolima se secaron siguiendo el modelo logístico. Las semillas de Cundinamarca se secaron siguiendo un modelo polinómico.

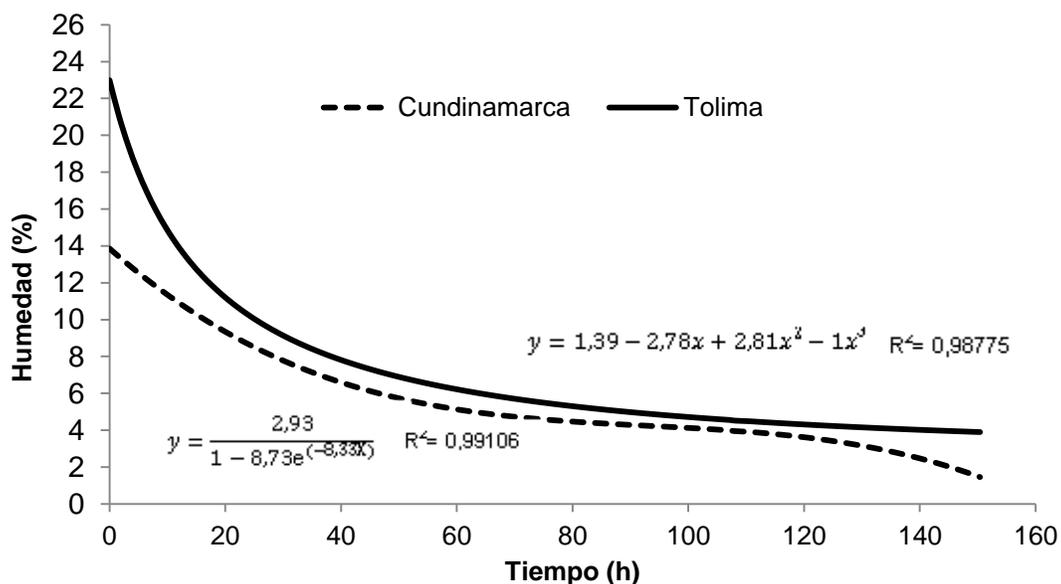


Figura 3-4. Curva de secado de semillas de anón, para las localidades de Apulo, Cundinamarca y Castilla, Tolima

El contenido de humedad inicial es mayor en las semillas obtenidas en la localidad del Tolima (23%). La pérdida de agua es rápida durante las primeras 40 horas de secado, tendiendo a la estabilización o pérdida lenta de agua (humedad cercana a 5%) alrededor de las 80 horas de secado. Las semillas de la localidad de Cundinamarca tienen una pérdida de humedad inicial no tan rápida como sus pares del Tolima y no sufren estabilización pues su contenido de agua disminuye durante todas las 144 horas de secado hasta una humedad menor al 2%.

Lobo *et al* (2007), obtuvieron curvas de secado para semillas de chirimoya y guanábana. En ambos casos el curso de la pérdida de humedad se ajustó a modelos cuadráticos

altamente significativos. Los autores obtuvieron un contenido de humedad del 7% en semillas de chirimoya luego de 128 horas de secado y de 145 horas en guanábana, a partir de contenidos iniciales de humedad de 33,6 y 36,5%, respectivamente. En semillas de *C. officinalis* y *A. graveolens* la humedad se equilibró a las 11 horas con un contenido de humedad de 2.78% y 4.2 % (Victoria *et al.*, 2007)

Viabilidad y humedad inicial

La humedad y viabilidad de las semillas antes de establecer los ensayos. Se encontró para las accesiones T7AS181 y T7AS181 de Castilla, (Tolima) una HR de 12,2, 11,9% y un porcentaje de viabilidad de 82%, 78%, y para las accesiones C2AS224, C2AS225 y C2AS226 de Apulo, Cundinamarca una HR de 10,7, 11,3 y 10,4% y porcentajes de viabilidad de 81% 76% y 87%.

Temperatura de germinación

Para las semillas de las dos localidades hubo efectos altamente significativos ($P \leq 0,001$) de la temperatura de incubación sobre el porcentaje de germinación (PG), la velocidad de germinación (VMG), el tiempo medio de germinación (TMG) y el índice de sincronía (E). La localidad y la interacción entre localidad y temperatura no tuvieron efectos sobre las variables (Tabla 3-5). El máximo porcentaje de germinación se obtuvo a una temperatura constante de 35 °C después de 30 días de incubación, para Cundinamarca y para Tolima (58 y 57% respectivamente). En general el PG fue drásticamente reducido a la temperatura de 30°C y 30°C/20°C y fue completamente nulo a temperatura ambiente (media: 18,7; máxima: 22,9; mínima: 17,3) (Figura 3-5 A). Las temperaturas alternas ofrecen una mejor germinación que las temperaturas constantes según lo expuesto por (Hartmann *et al.*, 1997), sin embargo en este estudio las temperaturas alternas tuvieron un efecto negativo sobre la expresión de la germinación.

Para las semillas provenientes de las dos localidades, el tiempo medio de germinación (TMG) no fue estadísticamente diferente entre las temperaturas de 35°C, 30°C y 30°C/20°C, pero si con la temperatura ambiente (media: 18,7; máxima: 22,9; mínima: 17,3), esto debido a que no se reportó germinación a los 30 días de evaluación. Sin embargo, se observó un menor TMG en las semillas provenientes de las dos localidades incubadas a una temperatura de 35°C (18,41 para Cundinamarca y 17,09 días para Tolima) (Figura 3-5 B). Una situación similar se observó para VMG. A temperatura ambiente (media: 18,7; máxima: 22,9; mínima: 17,3) las semillas presentan un VMG estadísticamente menor en comparación con las semillas incubadas en las demás temperaturas evaluadas, sin embargo, pese a que no hubo diferencias estadísticas entre 35°C, 30°C y 30°C/20°C, es posible apreciar como las semillas incubadas a 35°C presentan una VMG más alta (Figura 3-5 C). Para las dos localidades el índice de sincronización más bajo se obtuvo cuando las semillas se incubaron a 35°C durante 30 días, lo que indica que la germinación a esta temperatura fue más sincronizada en comparación con las temperaturas de 30°C y 30°C/20°C, pues bajos valores en este

valor indican una mayor sincronización en la germinación (Ranal y García de Santana, 2006) (Figura 3-5 D).

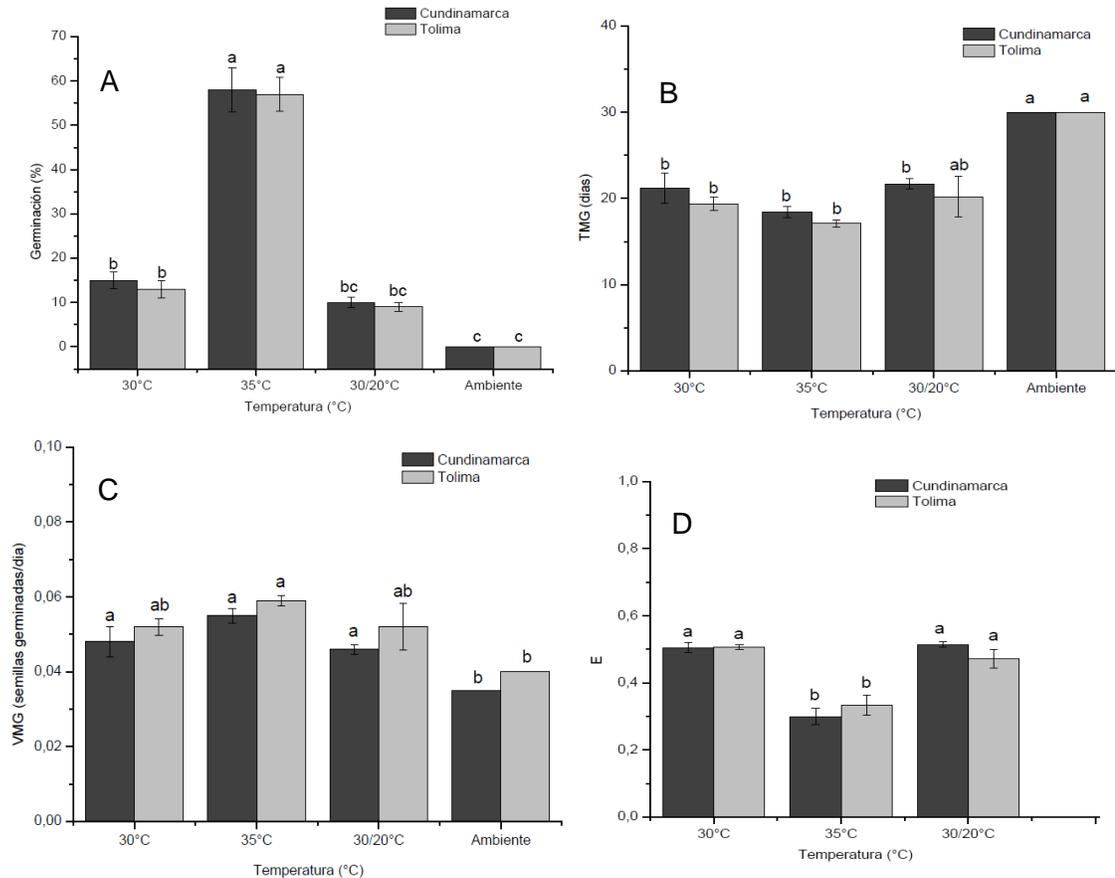


Figura 3-5. Efecto de las temperaturas sobre el porcentaje de germinación (PG), tiempo medio de germinación (TMG), velocidad media de germinación (VMG) y sincronización (E) en semillas de *A. squamosa* L. durante la incubación durante 30 días en turba húmeda. Letras diferentes en cada barra indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0,05$).

En las figuras 3-6 y 3-7 se presentan los resultados obtenidos con el análisis de regresión de los PG. Para las semillas obtenidas de Apulo, Cundinamarca, la función logística fue la que mejor describió el patrón de germinación en los tres regímenes de temperatura. A 35°C los valores del PG fueron mucho mayores a los obtenidos a 30°C y 30/20 °C. Durante los primeros 20 días se presentó un incremento acelerado del PG tendiendo a la estabilización a los 30 días de incubación. Para la localidad de Castilla, Tolima, el modelo logístico fue el que mejor describió el patrón de germinación para todas las temperaturas.

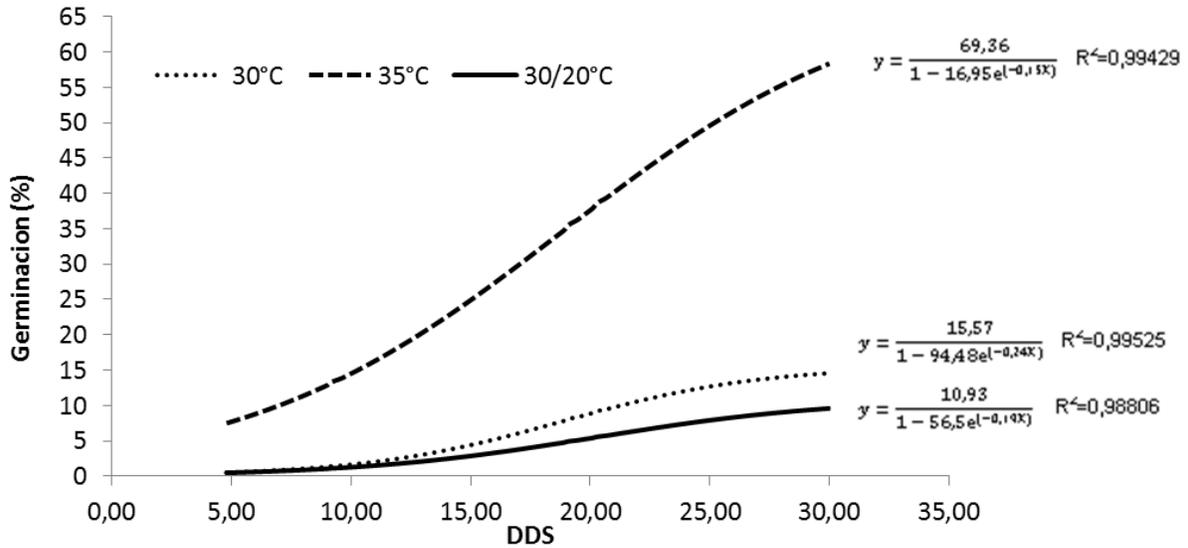


Figura 3-6. Porcentajes de germinación acumulada (PG) de semillas provenientes de Apulo, Cundinamarca, incubadas durante 30 días en turba húmeda bajo tres regímenes de temperatura.

El comportamiento de la curva logística para semillas germinando a 35°C, en la localidad del Tolima, indica que en los primeros 15 días se presentó un incremento acelerado del PG el cual llega a su máximo valor y se estabiliza luego a los 30 dds. En las dos localidades pueden apreciarse valores más altos en el PG cuando las semillas fueron incubadas a 35 °C, durante los 30 días de evaluación. Estos resultados coinciden con los expresados para PG, VMG, TMG y E, indicando que la temperatura de 35°C es la que permite una mejor expresión de la germinación. En contraste las temperaturas de 30°C y 30°C/20°C, tienen poco efecto sobre el potencial germinativo de la especie.

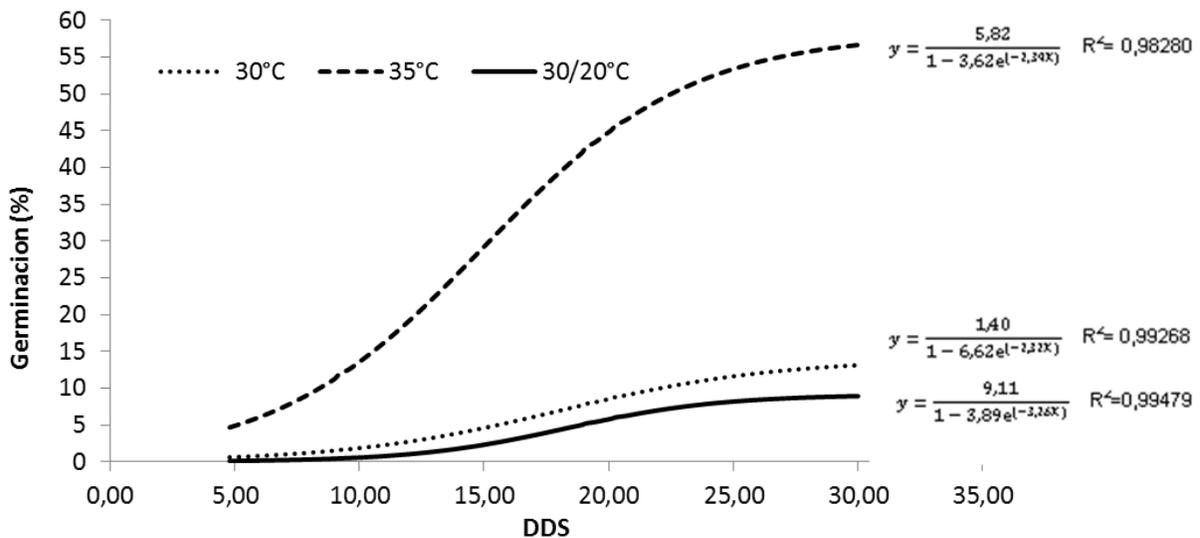


Figura 3-7. Porcentajes de germinación acumulada (PG) de semillas provenientes de Castilla, Tolima, incubadas durante 30 días en turba húmeda bajo tres regímenes de temperatura.

Nuestros resultados difieren de los encontrados por diferentes autores (Zucareli *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 1997; Ba *et al.*, 2012) en estudios de germinación en *Annona squamosa* L, y en otras especies. Los autores reportan que los mayores PG y VMG así como menores TMG se obtienen a una temperatura de 30°C y temperaturas alternas 20/30°C. Indican también que en temperaturas menores a 23 °C (20, 17 °C) y mayores a 30°C (33 y 42°C) causan los valores mas bajos en estas variables, limitando el potencial de germinación. Los autores concluyen que las semillas de *Annona squamosa* L. son indiferentes a las condiciones de luz y que las temperaturas elevadas favorecen el proceso germinativo, lo cual es corroborado por Kavati (1992), quien argumenta que esta especie es de clima cálido

Así mismo en otras especies de Annonaceae, *Annona montana* (Oliveira *et al.*, 2005), *Annona muricata*, *Annona emarginata* (SCHLTDL.) (Nepomuceno Costa *et al.*, 2011); también se ha reportado que la temperatura de germinación mas adecuada es 30°C, ya que se obtienen los valores mas altos de PG (no mayores al 61%) e IVG, mientras que temperaturas mayores o menores (17, 20, 35°C) las germinabilidad disminuye o no se presenta germinación. En otras especies como *A. cherimola* (Toll - Jubes *et al.*, 1975) *Annona senegalensis* (Ba *et al.*, 2012) el mejor PG fue obtenido a 25°C.

En especies como *Cecropia Glaziovii* (Godoi y Takaki, 2004) el mayor PG y VMG se obtiene una temperatura de 30°C, mientras que en *Albizia lebbbeck*, *Gliricidia sepium* y *Bauhinia purpurea* los mayores porcentajes de germinación final se obtuvieron a temperatura alterna de 25/35°C (Reino *et al.*, 2008).

Efecto de testa y temperatura sobre absorción de agua

En el presente estudio se presenta un modelo que explica las dos primeras fases del proceso de imbibición, lo cual es similar a los presentado por otros autores como Blacklow (1972), Hadas & Russo (1974), Bruckler (1983), Leopold (1983), Bouaziz & Bruckler (1989), Studdert *et al.* (1994), y Lopes *et al.* (1996; 2000). En las figuras 3-8 y 3-9 puede observarse el resultado de la absorción de agua por las semillas vivas de *Annona squamosa* L, para las localidades de Apulo, Cundinamarca y Castilla, Tolima en diferentes condiciones de temperatura de imbibición y eliminando las testas.

Las diferencias iniciales de peso se deben al aporte de la testa la cual tiene un 35% de participación en el peso fresco de la semilla. En las curvas para los tratamientos sin testa se apreció el cambio en la dinámica de la imbibición entre las 0 y 12 horas comparados con los tratamientos de semillas sin testa. Hubo un evidente incremento en la pendiente de las curvas para todas las temperaturas, lo cual significa una mayor velocidad de imbibición (esto corresponde a la fase 1, común para varias semillas). Esto indica que el potencial hídrico de la semilla en la fase inicial, es lo suficientemente negativo para lograr

la entrada del agua necesaria para iniciar los procesos de germinación (Vasquez – Yanes y Orozco – Segovia, 1993). Las curvas de las semillas con testa no presentan un incremento acelerado inicial del peso y su tiempo de estabilización es mayor. Esto pone en evidencia el efecto limitante de la testa sobre la absorción y velocidad en la toma de agua.

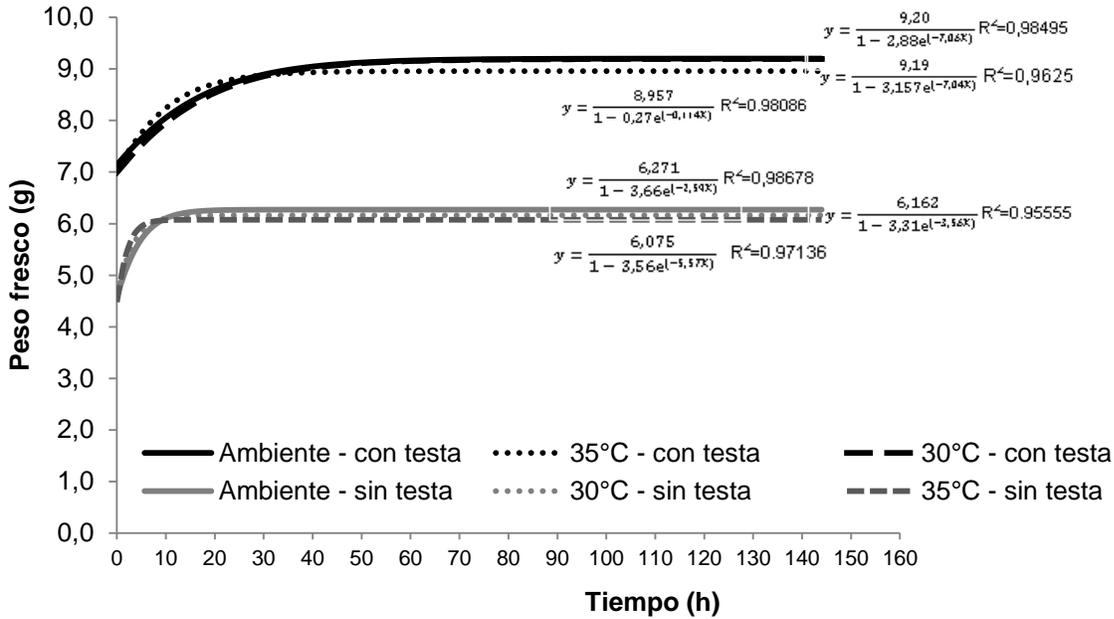


Figura 3-8. Incremento del peso fresco en semillas con y sin testa de *Annona squamosa* L. obtenidas de Apulo, Cundinamarca, durante el proceso de imbibición en tres regímenes de temperatura, 30°C, 35°C y T° ambiente (media: 18,7; máxima: 22,9; mínima: 17,3).

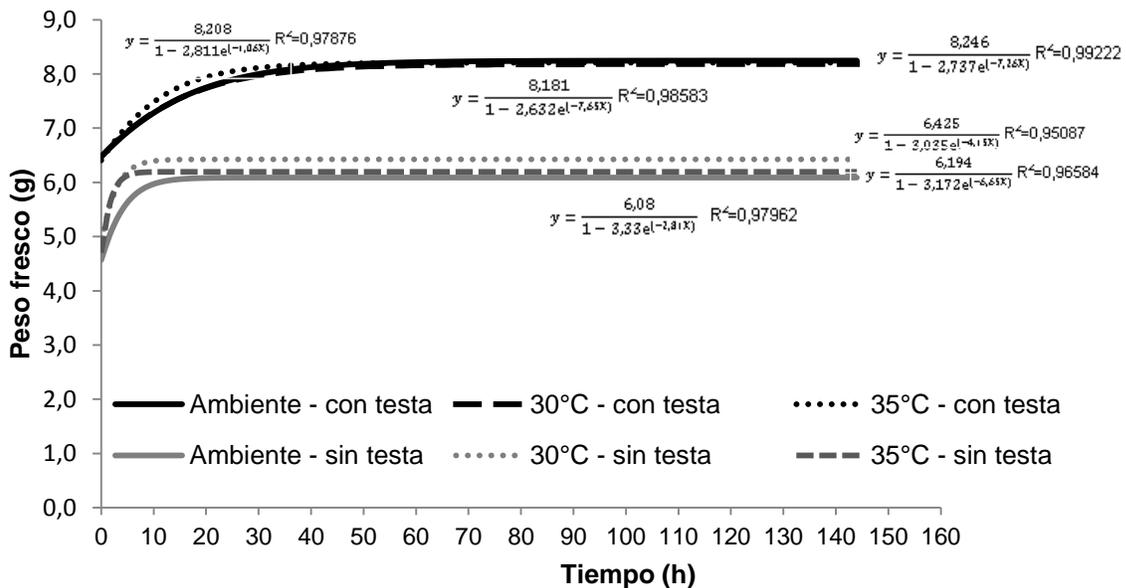


Figura 3-9. Incremento del peso fresco en semillas con y sin testa de *Annona squamosa* L. obtenidas de Castilla, Tolima, durante el proceso de imbibición en tres regímenes de temperatura, 30°C, 35°C y T° ambiente (media: 18,7; máxima: 22,9; mínima: 17,3).

Aunque el incremento de peso tendió a ser mayor en las semillas sin testa (Tabla 3-4) (lo que podría indicar limitaciones de la testa en términos de la ganancia de peso fresco de la semilla), no se evidencia impermeabilidad de la testa y por consiguiente latencia exógena o física, Baskin y Baskin (2001, 2004) debido a que también hubo ingreso de agua e incremento de peso en las semillas con testa. Esto puede deberse a la presencia o no cual de la testa tiene un 35% de participación en el peso fresco de la semilla. Aunque en las dos localidades, las semillas (con y sin testa) y en las temperaturas evaluadas se presentó un incremento considerable de peso.

Tabla 3-4. Porcentaje de Incremento en el peso fresco de semillas de *Annona squamosa* L. con y sin testas a los 144 días de imbibición en agua en tres regímenes de temperatura. Peso inicial Cundinamarca con testa: 6,98 g; sin testa: 4,62 g. Peso inicial Tolima con testa: 6,47g; sin testa: 4,70 g.

Tratamiento	% de incremento en peso fresco	
	Cundinamarca	Tolima
T° Ambiente - CT	22,41	21,49
T° Ambiente - ST	26,83	25,00
30°C - CT	24,00	20,84
30°C - ST	24,87	23,29
35°C - CT	21,60	21,95
35°C - ST	26,27	24,08

La toma de agua por la semilla seca es un proceso trifásico que consta de una rápida toma inicial de agua (fase I, imbibición) seguida de una fase de estabilización (fase II). Un aumento adicional en la toma de agua ocurre solo después de que la germinación es completada, en esta, el eje embrionario se elonga (Schopfer y Plachy, 1984; Leubner-Metzger *et al.*, 1995). La fase I es consecuencia del potencial mátrico y por lo tanto es un proceso físico que ocurre independientemente de la viabilidad y latencia de las semillas, desde que no haya impedimentos físicos. La Fase II o estacionaria ocurre un balance entre el potencial osmótico y el potencial de presión. En esta fase la semilla absorbe agua lentamente y el eje embrionario crece (Bewley & Black ,1994).

Para identificar el final de la fase I y el comienzo de la fase II en el presente estudio, se calculó el punto de inflexión $(t = \frac{\ln B}{A}, y = \frac{K}{2})$ sobre el modelo logístico, debido a que a partir de este punto se presenta una menor variación de los datos (cambio de concavidad de la curva). En este punto de la curva el peso fresco de las semillas llega a la mitad de su valor máximo posible “K”, y se inicia un crecimiento cada vez menor. Al ser la tasa de

variación del peso cada vez menor, se supone una menor toma de agua, lo que podría constituir el inicio de la fase II de toma de agua en donde la semilla absorbe agua lentamente y el eje embrionario crece (Bewley & Black, 1994).

En las semillas provenientes de Cundinamarca, los puntos de inflexión muestran que hubo grandes diferencias entre las semillas con testa y sin testa. Así mismo, es posible evidenciar diferencias entre las diferentes temperaturas de imbibición evaluadas. En las semillas con testa e imbibidas a una temperatura de 35°C el cambio de fase I a la Fase II se da cuando las semillas alcanzan un peso de 8,0 g, a las 11, 24 horas. A 30°C un peso similar se alcanzó hasta 16, 47 horas. A temperatura ambiente (media: 18,7; máxima: 22,9; mínima: 17,3), la fase I de imbibición finalizó a los 17,63 horas, con un peso de semilla de 8,17 g. En las semillas sin testa, la imbibición a 35 ° C cambió más rápidamente a la fase II de imbibición (1,85 horas) que al imbibir a temperaturas de 30°C y temperatura ambiente (3,11 y 3,88 horas respectivamente) (Tabla 7). El cálculo de los puntos de inflexión, permite evidenciar claramente el efecto de la testa en términos del cambio de la fase I a la fase II ó duración de la fase I (fase de absorción rápida de agua) e inicio de la fase dos (toma lenta de agua). Como se mencionó anteriormente, desde el punto de inflexión el aumento en peso fresco es cada vez menor hasta alcanzar el valor máximo "K" (parámetro calculado para cada curva del modelo logístico). Al comparar los puntos de inflexión entre las semillas con testa y sin testa, se observa que en las semillas sin testa el tiempo de duración de la fase I de imbibición es considerablemente menor que en las semillas con testa, así para 35°C el tiempo de la duración de la fase I de semillas sin testa fue 6 veces menor que en semillas con testa, en la imbibición a 30°C, la duración de la Fase I fue 5,3 veces menor y 4,5 veces menor para semillas sin testa imbibidas a T° ambiente (Tabla 3-5).

Tabla 3-5. Puntos de inflexión calculados obtenidos de las curvas de imbibición de semillas de *Annona squamosa* L. con provenientes de Apulo, Cundinamarca, con y sin testas, durante 144 días de imbibición en agua en tres regímenes de temperatura.

Tratamiento	Tiempo de duración Fase I (horas)	Peso fresco alcanzado (g) al finalizar Fase I
	$t = \ln a/b$	$y = K/2$
T° Ambiente - CT	17,63	8,17
30°C - CT	16,47	8,09
35°C - CT	11,24	7,99
T° Ambiente - ST	3,88	5,43
30°C - ST	3,11	5,40
35°C - ST	1,85	5,28

En las semillas provenientes del Tolima, los puntos de inflexión muestran que hubo grandes diferencias entre las semillas con testa y sin testa. Así mismo, fue posible

evidenciar diferencias entre las temperaturas en las que la imbibición fue evaluada. En las semillas con testa e imbibidas a una temperatura de 35°C la duración de la fase I de imbibición fue de 12 horas, en donde se alcanzó un peso fresco de 7,3 g. el mismo peso fue obtenido con una duración de la fase I de 17, 45 y 17, 84 horas para 30°C y T° ambiente (media: 18,7; máxima: 22,9; mínima: 17,3). En las semillas sin testa, la imbibición a una temperatura de 35°C generó la menor duración de Fase I (1, 72 horas) en comparación con 30°C y T° ambiente (2,87 y 3,91 horas). Similar a lo encontrado con las semillas provenientes de Apúlo, en las semillas de Castilla es posible evidenciar el efecto de testa con respecto a la duración de la fase rápida de imbibición, la cual tiene una menor duración (entre 5 y 7 veces menos) cuando las testas son eliminadas (Tabla 3-6).

Tabla 3-6. Puntos de inflexión calculados obtenidos de las curvas de imbibición de semillas de *Annona squamosa* L. con provenientes de Castilla, Tolima, con y sin testas, durante 144 días de imbibición en agua en tres regímenes de temperatura.

Tratamiento	Tiempo de duración	Peso fresco alcanzado
	Fase I (horas)	(g) al finalizar Fase I
	$t = \ln a/b$	$y = K/2$
T° Ambiente - CT	17,84	7,36
30°C - CT	17,45	7,33
35°C - CT	11,95	7,31
T° Ambiente - ST	3,91	5,33
30°C - ST	2,87	5,68
35°C - ST	1,72	5,45

De acuerdo con lo citado por Coll *et al.* (2001), el tiempo de la fase I, así como la velocidad y cantidad de agua imbibida varían con la naturaleza del integumento externo y de la especie. Carvalho y Nakagawa (2000) reportan que la fase I de imbibición es relativamente rápida, con una duración de una a dos horas. Ono *et al.* (1993) en semillas de macadámia reportan 90 horas de duración de la fase I, Rossetto *et al.* (1997), con semillas de soja reportan 12 horas, Braga (2003) con semillas de *Guazuma ulmifolia*, reportó 6 horas.

Para semillas de anonáceas se han sugerido periodos de imbibición de 24 horas (Garner y Chaudri, 1976) o hasta de 48 horas según lo expresado por Lemos *et al.* (1988), sin embargo, esto no puede ser generalizado para la diversidad de especies de anonáceas, ya que por ejemplo para atemoya, ese período varía entre 24 a 47 horas, dependiendo del método empleado. Por su parte Ferreira *et al.* (1997) determinaron para semillas de anón y atemoya duraciones de la fase I de 5 y 12 horas respectivamente. En atemoya (*Annona cherimola* Mill. X *A. squamosa* L.) cv. Gefner encontraron duraciones de 27 y 34

horas de la fase I de imbibición cuando se emplearon dos métodos de imbibición diferentes: caja de Petri con papel filtro y rollo de papel filtro respectivamente.

Efecto de la escarificación mecánica sobre la germinación

Para las semillas de las dos localidades hubo efectos altamente significativos ($P \leq 0,01$) de la escarificación mecánica sobre el porcentaje de germinación (PG), la velocidad de germinación (VMG) y el tiempo medio de germinación (TMG) más no sobre el índice de sincronía (E). El efecto de localidad solo presentó un efecto importante ($P \leq 0,001$) sobre el porcentaje de germinación. La interacción entre localidad y escarificación tuvo efectos significativos sobre las variables PG y E, lo cual puede apreciarse en la tabla 3-7.

Tabla 3-7. Significancia de la prueba F para escarificación mecánica en el porcentaje de germinación (PG), tiempo medio de germinación (TMG), velocidad media de germinación (VMG) y sincronización (E) en semillas de *A. squamosa* L. durante la incubación durante 30 días en turba húmeda.

	PG	TMG	VMG	E
Localidad (LOC)	***	NS	NS	NS
Escarificación (ESC)	***	**	**	NS
ESC * LOC	***	NS	NS	**

***= $P < 0.01$, **= $P < 0.01$, *= $P < 0.05$, NS= no significativo.

En las semillas provenientes de Apulo, los valores más altos de PG se obtuvieron con el tratamiento testigo, seguido de las semillas sin testas (64% y 56,8% respectivamente). Los demás métodos de escarificación lija distal y cortes apical distal, apical proximal y ventral generaron los más bajos PG en comparación con el testigo, lo que indica un efecto negativo de los mismos sobre esta variable. El PG máximo se obtuvo en las semillas sin testas provenientes de Castilla, Tolima. Su valor fue significativamente mayor (92%) con respecto de los demás tratamientos incluido el testigo (24,8%). En estas semillas el corte ventral también generó un PG estadísticamente mayor (53,6%) que el obtenido con el testigo, lo que indicaría que este método contribuye al incremento de la variable. Pese a que el PG obtenido con los métodos lija distal y corte apical distal no fue diferente al del testigo, tendieron a incrementar el valor de esta variable (Figura 3-10 A).

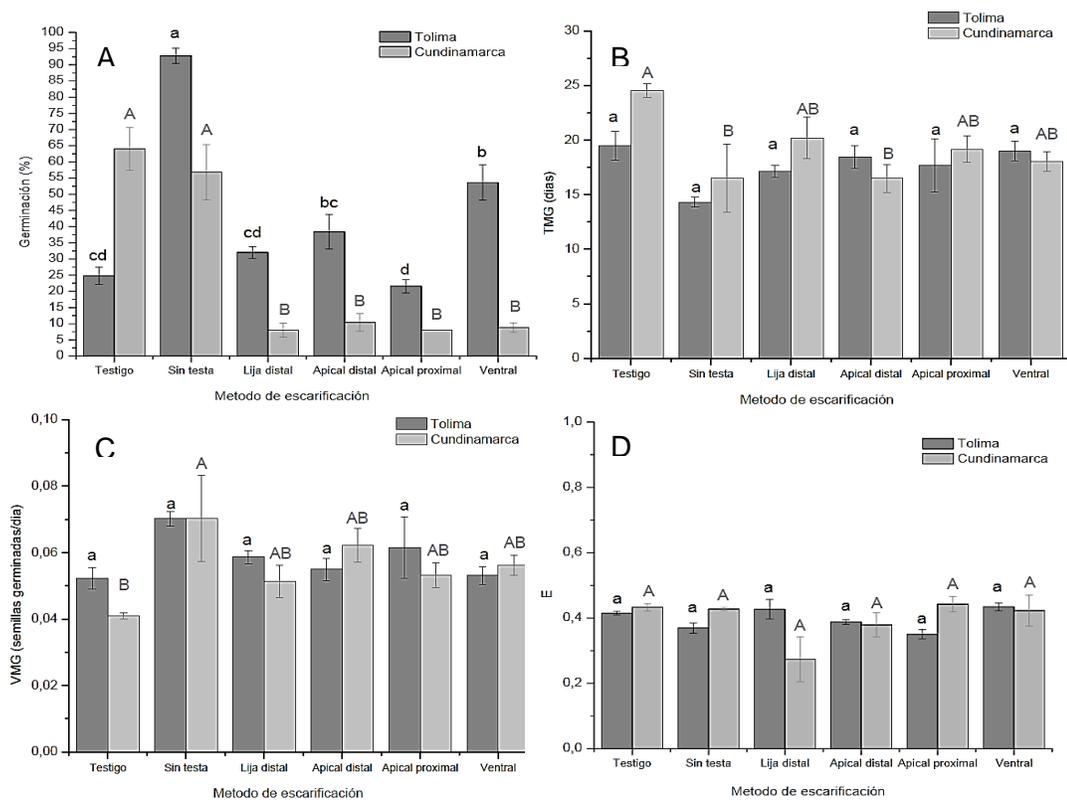


Figura 3-10. Efecto de diferentes métodos de escarificación sobre el porcentaje de germinación (PG), tiempo medio de germinación (TMG), velocidad media de germinación (VMG) y sincronización (E) en semillas de *A. squamosa* L. durante la incubación durante 30 días en turba húmeda. Letras diferentes en cada barra indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0,05$).

Menores tiempos de germinación (TMG) se registraron para las semillas sin testa en ambas localidades. En semillas del Tolima, el tiempo requerido para la máxima germinación no fue estadísticamente diferente entre los diferentes métodos, sin embargo, con la eliminación de testas se obtuvo un valor de 14,3 días, el cual tendió a ser menor que el encontrado para el testigo (19,47 días). Se evidenciaron diferencias significativas en las semillas provenientes de Cundinamarca con el testigo, en donde, tanto la eliminación de testas como el corte apical distal generaron una disminución significativa del TMG (16,5 días) en comparación con el testigo (24,52 días) (Figura 3-10 B). Las mayores velocidades de germinación se obtuvieron en las semillas sin testa para las semillas obtenidas de las dos localidades, aunque solo para las semillas de Cundinamarca se encontraron diferencias significativas con el testigo. En estas la eliminación de testas generó una VMG de 0,07 semillas germinadas/día mientras que con el tratamiento testigo se obtuvo un valor e 0,04 semillas germinadas /día. Los valores fueron similares para las semillas del Tolima, en estas, la eliminación de testas generó una VMG de 0,07 semillas germinadas /día y el tratamiento testigo un valor e 0,05

semillas germinadas /día (Figura 3-10 C). Para la localidad de Cundinamarca el índice de sincronización más bajo se obtuvo cuando a las semillas se les practicó una escarificación con lija en la parte distal, lo que indica que la germinación con este método fue más sincronizada en comparación con el testigo y los demás métodos de escarificación pues valores bajos indican una mayor sincronización en la germinación (Ranal y García de Santana, 2006). No hubo efecto significativo de los métodos de escarificación sobre el índice de sincronía para las semillas provenientes del Tolima (Figura 3-10 D).

Resultados similares fueron encontrados por Sousa *et al.* (2008). En este estudio los autores emplearon algunos métodos físicos para superar latencia en semillas de *A. squamosa* L., encontrando que la escarificación con lija no fue eficiente para la superación latencia, sin embargo, cuando la escarificación fue combinada con imbibición de las semillas en agua y un bioestimulante se presentó un aumento en el PG de 22 a 43%. Con relación a los métodos para superar latencia para semillas de *A. squamosa* L., encontrados en la literatura, se sugiere que pese a que la especie presenta semillas con tegumento externo rígido, la latencia de la especie no se debe a la impermeabilidad de este al agua (Sousa *et al.*, 2008). Esto es soportado por los resultados que hemos expuesto anteriormente y los obtenidos por Ferreira *et al.* (1997), a través de la realización de curvas de imbibición en donde se precisa que no hay impedimento físico para la toma de agua. Por su parte Coloauto *et al.* (2003) señalan que la escarificación con lija en el lado opuesto al micrópilo hasta visualizar el endocarpo de semillas de anón puede contribuir en el aumento de la permeabilidad del tegumento y la absorción de una solución de ácido giberélico empleada para superar latencia. Resultados similares fueron presentados por Pereira de Araújo (2008) en semillas de *Annona crassiflora* Mart. (Araticum), donde adicionalmente se reportó que la escarificación mecánica acompañada con inmersión en agua por 24 horas generó mayores porcentajes de germinación con respecto a los obtenidos con el uso de estratificación.

Esto indica que el empleo de la escarificación de forma aislada no posibilita la superación de la latencia en semillas de anón. Sin embargo, resultados diferentes fueron encontrados por Lemos *et al.* (1988) quienes reportaron que la escarificación con lija aumentó el porcentaje de germinación (75%) y la velocidad de emergencia en semillas de anón.

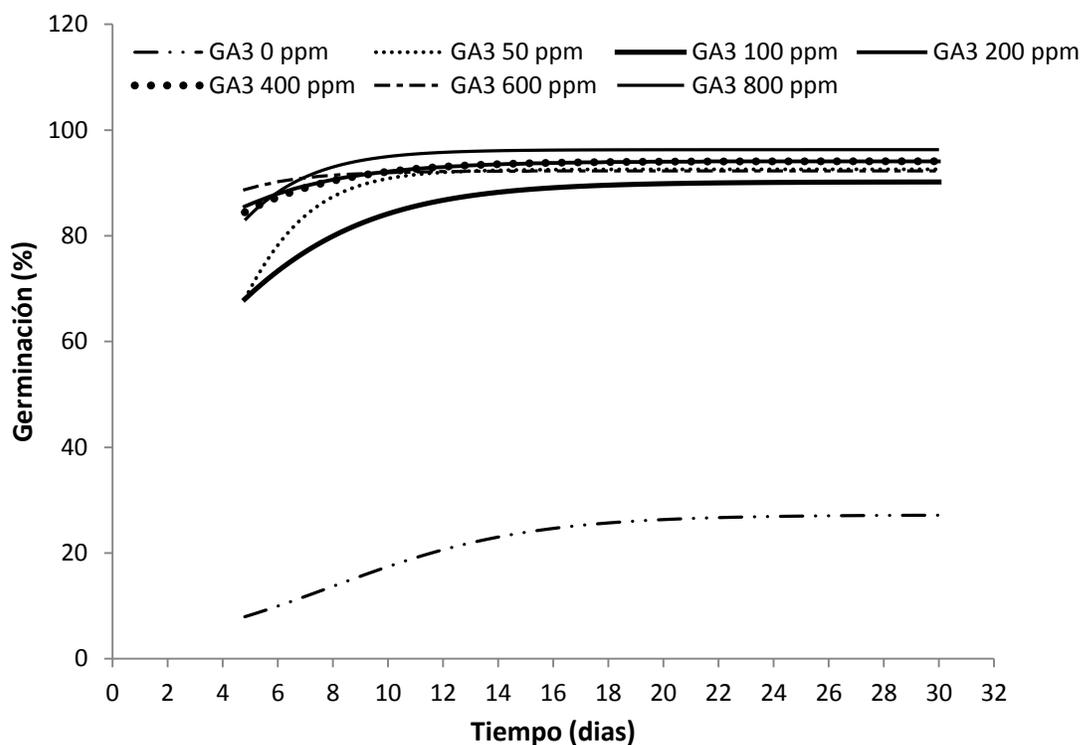
Sousa *et al.* (2008) reportó que tanto semillas lijadas e intactas presentaron porcentajes de germinación similares (4,0 y 3,0%, respectivamente) sugiriendo que la latencia en semillas de anón no es debida a la impermeabilidad de la testa. Ferreira *et al.* (2002) reportaron alteraciones significativas con la escarificación con lija más imbibición en un bioestimulante, consiguiendo un PG de 42% cuando se comparó con semillas no escarificadas, sin embargo, los índices de velocidad de germinación presentados no difirieron significativamente. Los autores concluyen que la escarificación mecánica con lija no proporciona una alteración significativa del PG en semillas de anón (Sousa, 2008).

Efecto del GA₃ sobre los patrones de germinación

En la figura 3-11 se observa el efecto de la aplicación de ácido giberélico sobre el PG de semillas de *A. squamosa* L. obtenidas de Castilla, Tolima y su variación durante 30 días de incubación. Sin la aplicación del fitoregulador (0 mg/kg) los porcentajes de germinación obtenidos durante la incubación son menores que los obtenidos con cualquier dosis de la hormona. A los 5 días de incubación se registró un PG de 8,8%. Según el cálculo del punto de inflexión para $t = \frac{\ln B}{A}$, durante los 8 primeros días de incubación el valor del PG crece en progresión geométrica, es decir, se presentan altas tasas en el crecimiento del PG hasta alcanzar la mitad del valor máximo de su carga (13,6%). Luego de los 8 días los incrementos en el PG son cada vez menores. El PG máximo = 27, 2%, se alcanza a los 30 días.

Con la aplicación de 200, 400, 600 y 800 mg/kg se observan las mejores respuestas de los PG durante el periodo de incubación. Bajo estas concentraciones los patrones de germinación son afines, presentando valores de PG mucho más altos que los encontrados para 0 mg/kg en los primeros 5 días de incubación (86,4; 85,6; 89,6 y 84,8% respectivamente).

Los menores tiempos en alcanzar el máximo PG se obtuvieron con la aplicación de 600 mg/kg de GA₃ a los 16 días (PG = 92,3%), seguido de 800 mg/kg de GA₃ a los 17,7 días (PG = 96,3%). 200, 400 mg/kg de GA₃ obtuvieron los valores máximos a los 22 días de incubación (PG = 94,1). Para estas mismas concentraciones la progresión geométrica del PG ó crecimiento acelerado de esta variable se presentó durante el día 1 de incubación.



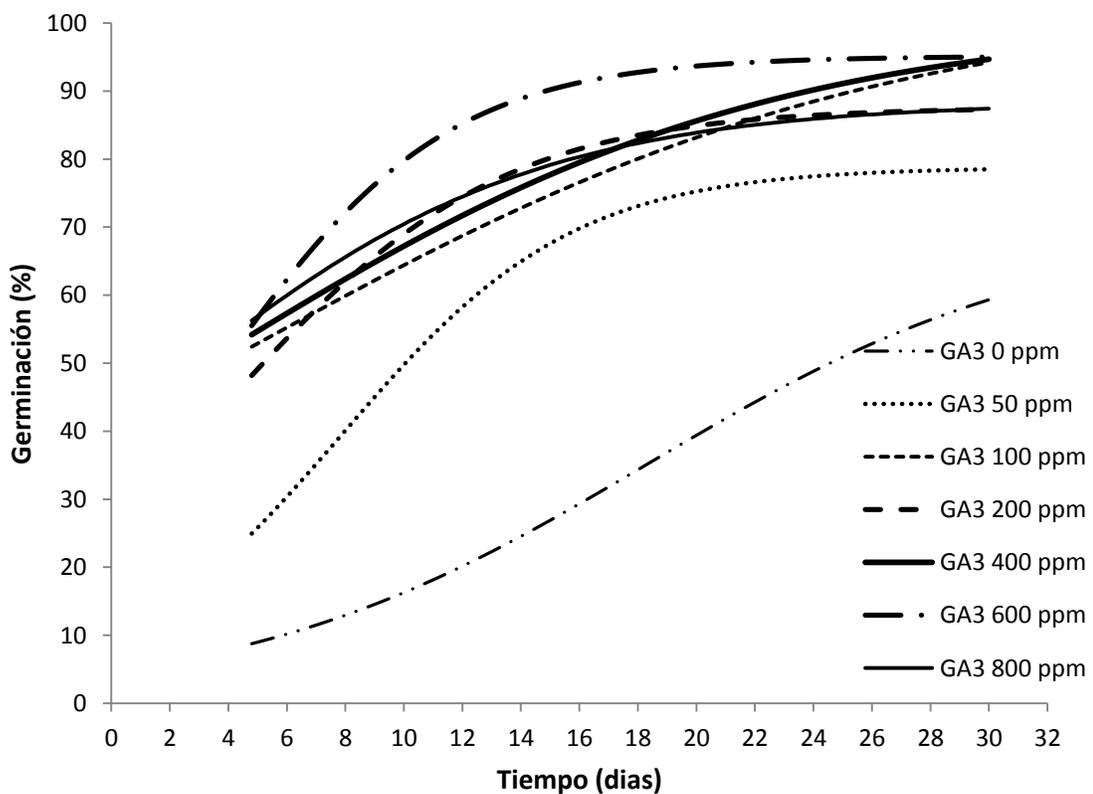
GA ₃ 0 mg/kg	$y = \frac{27.2067}{1 - 9.361e^{(-0.28X)}}$	R ² =0.99398	GA ₃ 200 mg/kg	$y = \frac{94.112}{1 - 0.419e^{(-0.29X)}}$	R ² =0.99696
GA ₃ 50 mg/kg	$y = \frac{92.5701}{1 - 5.40e^{(-0.56X)}}$	R ² =0.99341	GA ₃ 400 mg/kg	$y = \frac{94.0994}{1 - 0.535e^{(-0.32X)}}$	R ² =0.99809
GA ₃ 100 mg/kg	$y = \frac{90.199}{1 - 1.321e^{(-0.29X)}}$	R ² =0.99949	GA ₃ 600 mg/kg	$y = \frac{92.2718}{1 - 0.379e^{(-0.46X)}}$	R ² =0.92104
GA ₃ 800 mg/kg	$y = \frac{96.2871}{1 - 1.56e^{(-0.47X)}}$	R ² =0.99413			

Figura 3-11. Efecto del tratamiento de imbibición en una solución de agua + GA₃, sobre la germinación acumulada de semillas de *Annona squamosa* L. provenientes del municipio de Castilla, Tolima, durante 30 días de incubación en turba húmeda a una temperatura de 35°C y humedad de 60%.

Los patrones de germinación generados por efecto e la aplicación de diferentes concentraciones de GA₃, en semillas de anón provenientes de Apulo, tuvieron un comportamiento similar a las semillas provenientes de la localidad de Castilla (Figura 3-12). Sin la aplicación del fitoregulador (0 mg/kg) los porcentajes de germinación obtenidos durante la incubación son menores que los obtenidos con cualquier dosis de la hormona. En este caso a los 5 días de incubación se registró un PG de 9.6%, que se incrementó hasta un valor de 59,3% a los 30 días de evaluación. Al analizar el punto de inflexión calculado, se observa que la fase de crecimiento acelerado del PG se da hasta

los 18,9 días, en donde se alcanza la mitad del valor máximo de carga (36,6%) luego de lo cual la tasa de crecimiento del PG se ralentiza.

Las semillas tratadas con GA3 a una concentración de 600 mg/kg, presentan los valores más altos de PG durante el tiempo e incubación. El máximo PG de 95%, se obtiene con el menor tiempo de incubación (entre 24 y 28 días) en comparación con las demás concentraciones. El periodo de crecimiento acelerado finaliza en el día 3,5 de incubación y como resultado hacia el día 5 de germinación se obtiene un PG de 56,8%. La curva que refleja el tratamiento con 800 mg/kg de GA3 presenta una dinámica similar a la encontrada con el tratamiento de las semillas con 600 mg/kg, aunque el tiempo para alcanzar el valor máximo de PG (88,4%) se obtiene, según la proyección del modelo y de los parámetros, después del último día de incubación registrado. El periodo de crecimiento acelerado fue de 1,22 días y generó un PG de 56,8% en el 5 día de incubación.



GA ₃ 0 mg/kg	$y = \frac{70,348}{1 - 14,05e^{(-0,14X)}}$	R ² =0,99272	GA ₃ 200 mg/kg	$y = \frac{87,6346}{1 - 2,273e^{(-0,21X)}}$	R ² =0,9756
GA ₃ 50 mg/kg	$y = \frac{78,7976}{1 - 7,220e^{(-0,25X)}}$	R ² =0,97243	GA ₃ 400 mg/kg	$y = \frac{100,423}{1 - 1,412e^{(-0,10X)}}$	R ² =0,99292
GA ₃ 100 mg/kg	$y = \frac{103,45}{1 - 1,508e^{(-0,09X)}}$	R ² =0,98739	GA ₃ 600 mg/kg	$y = \frac{95,138}{1 - 2,389e^{(-0,25X)}}$	R ² =0,98012

$$\text{GA}_3 \text{ 800 mg/kg} \quad y = \frac{88.4138}{1 - 1.202e^{(-0.15X)}} \quad R^2=0.97761$$

Figura 3-12. Efecto del tratamiento de imbibición en una solución de agua + GA₃, sobre la germinación acumulada de semillas de *Annona squamosa* L. provenientes del municipio de Apulo, Cundinamarca, durante 30 días de incubación en turba húmeda a una temperatura de 35°C y humedad de 60%.

Existen pocos estudios que describan patrones de germinación para especies de anonáceas. Stenzel *et al.* (2003) encontraron que el período de germinación de las semillas de atemoya de los cultivares “Gefner” y “PR-3” y de Anón, cuando fueron tratadas con 50 a 100 mg/kg ocurrió principalmente entre los 14 y 28 días. La germinación de semillas del cultivar “PR-1” de atemoya se presentó principalmente entre los 21 y 42 días cuando se aplicó 50 mg/kg de GA₃. Jubes *et al.* (1975) encontraron un mayor porcentaje de germinación entre los días 7 y 38 en semillas de chirimoya escarificadas e imbibidas en una solución de GA₃ y agua. Pawshe *et al.* (1997) observaron un mayor porcentaje de germinación en las evaluaciones realizadas a los 22 y 26 días en semillas de *Annona squamosa* L inmersas en GA₃ a 50 y 100 mg/kg.

En nuestro estudio se observaron diferencias entre la respuesta de los patrones de germinación de las semillas de Castilla, Tolima y las semillas de Apulo, Cundinamarca a la aplicación de GA₃. Durante los primeros 5 días de incubación los valores de PG en las semillas de Apulo fueron menores (PG > 50%) que los obtenidos para las semillas de Castilla (PG > 70%). Los tiempos de obtención del valor máximo de germinación (PG máximo “K”) fueron menores para las semillas de Castilla que los encontrados para las semillas de Apulo, en donde para la mayoría de las concentraciones el valor máximo del PG se obtiene después del último día de incubación evaluado, lo que indica que en las semillas del Tolima la estabilización de la curva se da en un menor tiempo. Finalmente para todas las concentraciones de GA, los períodos ($t = \frac{\ln B}{A}$) de crecimiento acelerado del PG fueron menores en las semillas obtenidas de Castilla, Tolima.

Efecto del GA₃ sobre las variables de germinación

Hubo un efecto altamente significativo ($P \leq 0,01$) del tratamiento con GA₃ sobre el porcentaje de germinación (PG), la velocidad de germinación (VMG), el tiempo medio de germinación (TMG) y el índice de sincronía (E). La respuesta de las variables TMG, VMG y E fue diferente ($P \leq 0,01$) entre las semillas provenientes de Castilla, con las provenientes de Apulo. La interacción entre localidad y tratamiento con GA₃ tuvo efectos significativos únicamente sobre la variable PG, lo cual puede apreciarse en la tabla 3-8.

Tabla 3-8. Significancia de la prueba F para el efecto del tratamiento con GA₃ sobre el porcentaje de germinación (PG), tiempo medio de germinación (TMG), velocidad media de germinación (VMG) y sincronización (E) en semillas de *A. squamosa* L. durante la incubación durante 30 días en turba húmeda.

	PG	TMG	VMG	E
Localidad (LOC)	NS	***	***	***
GA₃	***	***	***	***
GA₃ X LOC	***	NS	NS	NS

***= P<0.01, **=P<0.01, *=P<0.05, NS= no significativo.

El porcentaje de germinación (PG) de las semillas de ambas localidades se vio influenciado por la aplicación de externa de GA₃ tal como se aprecia en la figura 3-13 A. Todas las concentraciones incrementaron significativamente el PG final (30 días de incubación) en comparación con el control (0 mg/kg), tanto para las semillas de Apulo como para las de Castilla. Sin embargo entre las concentraciones evaluadas (50, 100, 200, 400, 600 y 800 mg/kg) no se presentaron diferencias estadísticas significativas. En las semillas provenientes de Apulo, los más altos valores de PG fueron obtenidos por el tratamiento con 400 y 600 mg/kg (96,8 y 97,6% respectivamente) que en comparación con el control (59,2%) significo un incremento del 63 y 64,9% del PG. En las semillas provenientes de Castilla, es posible observar una tendencia en la cual el PG se incrementa con los aumentos de concentración de GA₃. Todas las concentraciones contribuyeron a un importante incremento del PG (> 200%) y aunque las diferencias entre estas son mínimas, la aplicación de 800 mg/kg generó los valores más altos del PG (96%), lo que significó un incremento del 252% sobre el control (PG=27,2%).

Resultados similares fueron obtenidos por Pawshe *et al.* (1997), Stenzel *et al.* (2003) y Menegazzo *et al.* (2011), quienes con bajas concentraciones de GA₃ (50 y 100 mg/kg respectivamente), observaron los mejores PG (cercaos al 75%), reportando el ultimo autor imbibiciones durante 5 y 24 horas como suficientes. Sousa *et al.* (2005), obtienen un PG de 90% con la imbibición durante 12 horas en 400 mg/kg de GA₃, indicando que las dosis de 50 a 750 mg/kg también tiene resultados positivos. Ferreira *et al.* (1998; 2002), reportaron que la aplicación de 200 y 250 mg/kg de GA₃ promovió considerablemente el aumento e la germinación (77%) de *A. squamosa* L. en condiciones de cámara de germinación y a una temperatura alterna de 20 y 30°C. Asi mismo Lima-Brito *et al.* (2006) encontraron que el uso de GA₃ entre 250 y 1000 mg/kg incrementa el PG y el IVG de las semillas.

Nuestros resultados fueron muy similares a lo encontrados por diversos autores en semillas de *Annona squamosa* L, estos indican que hay una respuesta positiva del PG a

la aplicación de GA₃ en diferentes concentraciones. Sin embargo en otras especies de Annonaceae se reportan los mismos efectos positivos. Smet *et al.* (1999), en chirimoya reportaron que con las concentraciones de 500, 1000, 5000, 10.000 mg L⁻¹ de GA₃, se obtienen germinaciones de 58,5; 65,5; 69,5; e 74,5% respectivamente. Esquinca *et al.* (1997), indica que las semillas de *A. diversifolia* presentan latencia que puede ser superada con el uso de ácido giberélico. Pinto (1976), en *Annona muricata* L. obtuvo un 82,1% de germinación con el uso de 300 mg/kg de ácido giberélico. Por su parte Hernández (1999), indica que el ácido giberélico en una concentración de 100 mg/kg promueve significativamente el aumento de la germinación de *Annona cherimola* L. hasta un 70%.

Ferreira *et al.* (2002b e 2002b), en los cultivares “Gefner” y “Tompson” de atemoya obtuvieron diferencias significativas entre las concentraciones 500, 750 y 1000 mg L⁻¹ de GA₃ para el cultivar Tompsom y 1.000 mg L⁻¹ de GA₃ para el cultivar Gefner en comparación con el testigo. De la misma forma Stenzel *et al.* (2003), observaron diferencias entre el testigo y concentraciones de GA₃ (50 y 100 mg/kg) Utilizadas para tres cultivares de atemoya (‘Gefner’, ‘PR-1’ e ‘PR-3’).

Menores tiempos de germinación se registraron con el tratamiento de las semillas de ambas localidades con GA₃, es posible observar una tendencia de disminución de los TMG a medida que se incrementa la concentración de GA₃ (Figura 3-13 B). En las semillas provenientes de Cundinamarca el tiempo requerido para la máxima germinación (TMG) no fue estadísticamente diferente entre las diferentes concentraciones, sin embargo el tratamiento con 600 mg/kg presentó los mejores valores para la variable al disminuir de 17,68 días (dato del control a 0 mg/kg) a 8,75 días el TMG. Igualmente en la localidad de Castilla Cundinamarca el tiempo requerido para la máxima germinación (TMG) no fue estadísticamente diferente entre las diferentes concentraciones, sin embargo las concentraciones de 200, 400, 600 y 800 mg/kg generaron los valores más bajos de TMG (5,52; 5,55; 5,38 y 5,82 días) en comparación con el testigo (10,88 días). Nuevamente, se presentan diferencias significativas en los TMG entre las dos localidades. En esta ocasión, los valores de TMG de las semillas de Tolima son menores que los registrados para la localidad de Apulo, en todas las concentraciones incluido el control.

Comparado con el control (0 mg/kg), el tratamiento de las semillas de *A. squamosa* L con GA₃ en todas las concentraciones, fue eficiente en la promoción de mayores VMG (Figura 3-13 C). Es posible observar en los resultados para las semillas de las dos localidades una tendencia a aumentar las VMG a medida que se incrementan las concentraciones desde 0 a 600 mg/kg de GA₃. La concentración de 600 mg/kg de GA₃ generó los más altos valores de VMG tanto para las semillas de Castilla como para las de Apulo (0,18 y 0,12 semillas germinadas/día respectivamente), comparado con los valores de sus controles respectivos (castilla = 0,09 y Apulo = 0,06 semillas germinadas/día), sin embargo las semillas de la localidad de Castilla presentaron valores significativamente mayores de VMG (con respecto al control), que las semillas de Apulo en cada

concentración evaluada, lo que indica una mayor influencia del GA₃ sobre la VMG de las semillas de Castilla, Tolima.

Sousa *et al.* (2008), encontraron que los mayores índices de velocidad de germinación fueron obtenidos con los tratamientos de GA₃

Incrementos en las velocidades de germinación en semillas de *A. squamosa* L. también fueron encontrados con la aplicación de GA₃ por Ferreira *et al.* (1999) (250 mg/kg), Jubes *et al.* (1975) y Stenzel *et al.* (2003) (50 y 100 mg/kg). Los mismos autores Stenzel *et al.* (2003) en atemoya indican que el GA₃ promueve el aumento la velocidad de germinación en donde se obtuvieron IVG de 0,48 para cultivar "Gefner" y 0,46 para el cultivar "PR-3".

En las semillas provenientes de Cundinamarca solo la concentración de 600 mg/kg de GA₃ fue eficiente en la promoción de una germinación mas sincronizada al generar un índice de sincronización significativamente mas bajo (0,34) que el control (0,41). Por el contrario, en las semillas provenientes del Tolima se observa una tendencia de disminución del índice de sincronía a medida que se incrementan las concentraciones de GA₃. En este caso el control (0,45) genera un índice de sincronización mas bajo. Nuevamente es posible evidenciar diferencias en la respuesta de las dos localidades, siendo las semillas del Tolima mas influenciadas por la aplicación de GA₃ que las semillas de Cundinamarca (Figura 13-13 D).

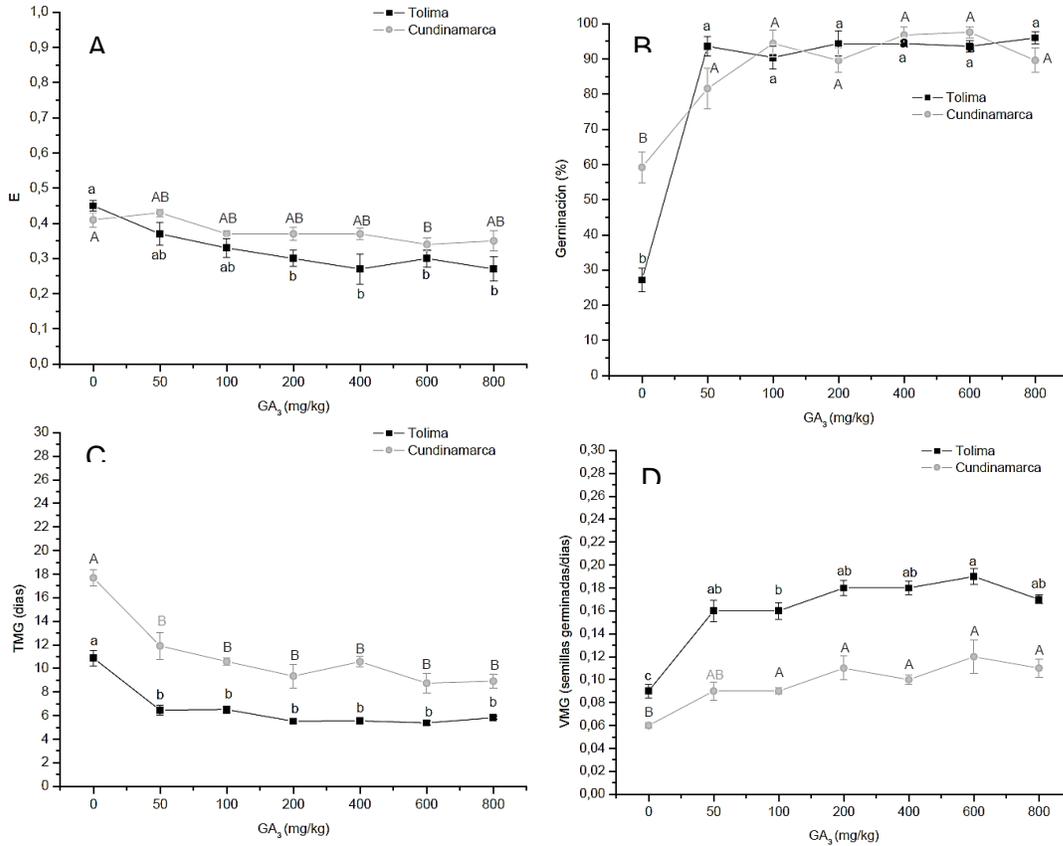


Figura 3-13. Efecto de diferentes concentraciones de GA₃ sobre el porcentaje de germinación (PG), tiempo medio de germinación (TMG), velocidad media de germinación (VMG) y sincronización (E) en semillas de *A. squamosa* L. durante la incubación durante 30 días en turba húmeda. Letras diferentes en cada barra indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P<0,05).

Efecto de la estratificación caliente Húmeda sobre las variables de germinación

La significancia del efecto de la estratificación a 25 °C durante 15, 30 y 45 días sobre las semillas de *A. squamosa* L. se presenta en la tabla 11. Los resultados del análisis de varianza indican que las variables evaluadas PG, TMG, VMG y E son influenciadas tanto por la proveniencia de las semillas, por la estratificación y por el efecto conjunto de la localidad y la estratificación (Tabla 3-9).

Tabla 3-9. Significancia de la prueba F para el efecto del tratamiento de estratificación caliente húmeda por 15, 30 y 45 días en el porcentaje de germinación (PG), tiempo medio de germinación (TMG), velocidad media de germinación (VMG) y sincronización (E) en semillas de *A. squamosa* L. durante la incubación durante 30 días en turba húmeda.

	PG	TMG	VMG	E
Localidad	***	***	***	*
Estratificación	***	***	**	**
Estratificación X Localidad	**	*	*	NS

***= P<0.01, **=P<0.01, *=P<0.05, NS= no significativo.

Hubo un efecto negativo de la estratificación sobre el PG, aunque las respuestas en las semillas de las dos localidades evaluadas fueron diferentes. En las semillas provenientes de Cundinamarca, con respecto al control, se observó una disminución significativa del PG a medida que se incrementa el tiempo de estratificación, en donde se pasó de un PG de 64% a los 0 días a un PG de 24,8% cuando las semillas duraron 45 días en el sustrato a 25°C. En las semillas del Tolima la estratificación por 15 y 45 días disminuyó significativamente el valor de PG, mientras que la estratificación durante 30 días no causó un efecto importante (Figura 3-14 A). El comportamiento del TMG también fue diferente para las dos localidades. En las semillas de Cundinamarca se observó que los menores tiempos de germinación TMG se obtuvieron con la estratificación por 15 y 45 días (17,57 y 17,41 días) indicando que estos tratamientos disminuyeron significativamente el valor de la variable en comparación con el control (24,51 días). Para las semillas del Tolima, los menores tiempos de germinación se obtuvieron con la estratificación por 15 y 30 días (10 y 11,49 días) que en comparación con el control (17,14 días) significa una significativa influencia de los tratamientos sobre la variable (Figura 3-14 B). La VMG (Figura 3-14 C) fue incrementada cuando las semillas se estratificaron durante 15 días, seguido de 30 días en las semillas provenientes del Tolima, mas solo el valor de VMG obtenido con la estratificación con 15 días (0,11 semillas germinadas/día) fue significativamente diferente al control (0,05 semillas germinadas/día). En las semillas provenientes de Cundinamarca, ningún tratamiento de estratificación incremento significativamente el valor de la variable VMG, así mismo no hubo variación significativa para el índice de sincronía E. En las semillas del Tolima, una germinación mas sincronizada fue generada por la estratificación durante 15 días, tiempo en el cual se obtuvo como respuesta un menor índice de sincronía (Figura 3-14 D).

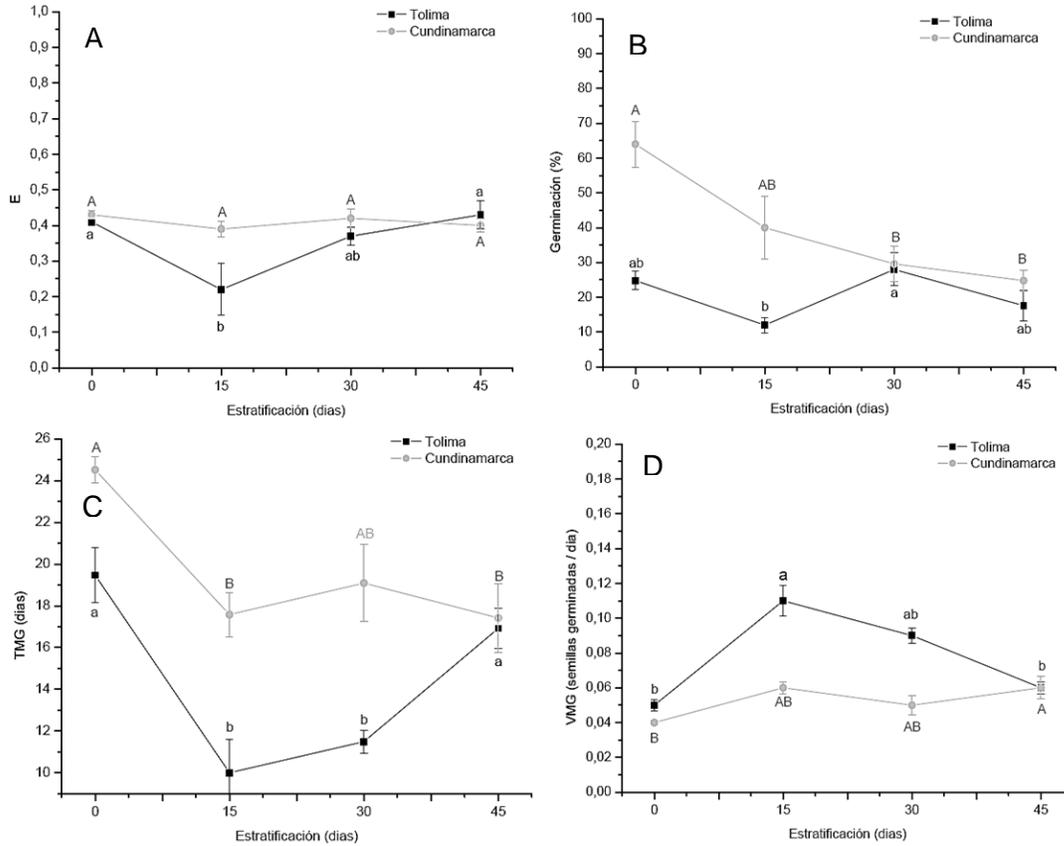


Figura 3-14. Efecto de tres periodos de estratificación caliente (25°C) húmeda sobre el porcentaje de germinación (PG), tiempo medio de germinación (TMG), velocidad media de germinación (VMG) y sincronización (E) en semillas de *A. squamosa* L. durante la incubación durante 30 días en turba húmeda. Letras diferentes en cada barra indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P<0,05).

En contraste con nuestros resultados Lobo *et al.* (2007) reportaron que la estratificación caliente en ambiente húmedo, a los 30, 60 y 90 días, causó un incremento en el PG de chirimoya (45,7; 44,9 y 52,7% respectivamente) en comparación con el testigo (12%). En el caso de la guanábana, la estratificación caliente húmeda produjo un PG de 14,4 y 22,7 % en las semillas sometidas a ésta por espacios de 60 y 90 días.

3.3 Discusión

Temperatura de germinación

La temperatura afecta la germinación y la tasa de germinación final varía con la temperatura (Come *et al.*, 1982). Borges y Rena (1993), postulan que la temperatura de 20 a 30° C es adecuada para la germinación de semillas de la mayoría de las especies tropicales. Sin embargo, en un estudio realizado por Cavalcante y Perez (1995), las

especies tropicales presentan una notable tolerancia a altas temperaturas, mostrando generalmente un límite máximo $\geq 35^{\circ}$ C, en tanto estas son sensibles a temperaturas bajas, presentando generalmente límite inferior sobre 5° C. En el presente estudio los mejores valores obtenidos para todas las variables evaluadas (PG, TMG, VMG y E) fueron obtenidos a una temperatura constante de 35° C pudiéndose considerar esta, como la temperatura óptima de germinación, si tenemos en cuenta que Mayer y Poljakoff-Mayber (1989), consideran que la temperatura óptima de germinación es aquella en la que se obtiene el más alto porcentaje de germinación en el menor tiempo. Castro (2003), obtuvo resultados similares estudiando semillas de *Tabebuia capitata*. El autor verifica que con las temperaturas de 30 y 35° C se obtienen los mayores porcentajes de germinación, emergencia y para formación de plántulas normales. Sin embargo, nuestros resultados difieren de los encontrados por otros autores en la misma especie y con especies relacionadas en diferentes regiones del mundo, en donde hay un mejor comportamiento de las variables de germinación en temperaturas no mayores a 30° C. Esto puede deberse a que a esta temperatura la permeabilidad de la testa al agua es mayor que a 30° C según lo observado en la curva de imbibición para las dos localidades (Figuras 3-9 y 3-10). De acuerdo con Tybirk (1991), las altas temperaturas contribuyen al ablandamiento de la cubierta seminal y aseguran una mejor permeabilidad de esta al agua y el aire. Adicionalmente, las temperaturas óptimas de germinación varían de una especie a otra (Ba *et al.*, 2012) o incluso entre semillas de la misma especie debido a la región de donde fueron obtenidas (Harty y Butler, 1975).

En nuestro estudio las temperaturas menores a 35° C: 30° C, $20/30^{\circ}$ C y temperatura ambiente (media: 18,7; máxima: 22,9; mínima: 17,3) presentaron bajos valores de PG, TMG, VMG y E en *A. squamosa* L. Según Carvalho y Nakagawa (2000) temperaturas bajo la óptima tienden a reducir la velocidad del proceso germinativo, exponiendo las plántulas por mayor periodo de tiempo a factores adversos, pudiendo llevar a la reducción total de la germinación. Comparaciones entre diferentes estudios en temperaturas fluctuantes muestran que la germinación se dificulta debido a diversos factores como la presencia de temperaturas máximas y mínimas, y su duración y la tasa de calentamiento y enfriamiento de las semillas debido a estas fluctuaciones (Bewley y Black, 1982).

Tanto en Apulo como en Castilla la temperatura fue un factor limitante para la germinación de las semillas de *A. squamosa* L. ya que las temperaturas en ambas regiones no superan los 30° C. El comportamiento de las semillas que no germinan puede deberse a que las condiciones de germinación no son efectivas para desbloquear la latencia primaria (Bewley y Black, 1994). Los resultados muestran que las semillas de ambas localidades son dependientes de la temperatura para su germinación. De acuerdo con Armitage (1994) la temperatura es el factor ambiental más importante en el control de la germinación debido a sus efectos sobre los cambios en la membrana plasmática y mitocondria así como en la desnaturalización de proteínas (Van Vuuren y Lubbe, 2000).

El fenómeno de latencia en *Annona squamosa* L.

La latencia está determinada por las propiedades físicas y fisiológicas de la semilla (Nikolaeva, 1967, 2004). Al respecto Baskin y Baskin (1998, 2004) han propuesto un sistema de clasificación que incluye cinco clases de latencia de semillas: fisiológica (PD, por sus siglas en inglés), morfológica (MD), morfofisiológica (MPD), física (PY) y combinada (PY + PD).

En diversos géneros y especies de la familia Annonaceae dentro de las que esta *A. squamosa* L, se ha reportado la presencia de latencia morfológica y morfofisiológica (Baskin y Baskin, 2001). La primera ocurre en semillas con embriones rudimentarios y laminares, en las cuales la mayoría de la semilla está ocupada por el endospermo (semillas endospermicas) y el embrión corresponde aproximadamente a un 1% del volumen de la unidad de propagación sexual (Nikolaeva, 1969); estos presentan diferenciación, sin estar latentes y simplemente necesitan tiempo para crecer y germinar (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Con relación a los taxa cultivados de *Annona*, se ha señalado que las semillas presentan generalmente una germinación irregular, lo que dificulta la propagación sexual (Pinto, 2005b; Padilla y Encina, 2003). Igualmente, se ha afirmado que este tipo de comportamiento es debido a diferentes niveles de latencia (Ferreira *et al.*, 1999; Moreno *et al.*, 1999; Pinto, 1975), con reportes no concordantes sobre la presencia o ausencia de ésta, lo cual ha sido atribuido, por Pinto (2005a), al grado de madurez de la semilla y a que ésta puede ser inducida por factores climáticos, en lugar de ser innata.

En las semillas de *Annona squamosa* L. la germinación es errática y lenta. Algunos autores han reportado que la germinación puede tomar entre 30 (Morton, 1987; Cruz, 2002), 50 días (Hernandez, 1983) y hasta 90 días (Hayat, 1963). Colauto *et al.* (2003) reportaron germinaciones de *Annona squamosa* L sin tratamientos de remoción de latencia, del orden del 1 hasta 3,8% en un período de 63 días. En esta especie se ha reportado latencia física (Lemos *et al.*, 1988), latencia morfológica (Lobo *et al.*, 2007, Baskin y Baskin, 2001). Adicionalmente, varios autores han reportado que esta especie presenta sustancias inhibitoras de la germinación que provocan latencia lo que, juntamente con un tegumento resistente e impermeable, proporcionan factores antagónicos a una germinación rápida y uniforme (Pawshe *et al.*, 1997; Smet *et al.*, 1999, Stenzel *et al.*, 2003).

Con respecto a la latencia física, la cual es causada por capas de células en palizada impermeables al agua y en donde la escarificación mecánica o química es requerida para su rompimiento (Baskin y Baskin, 1998; 2004) nuestros datos no mostraron una clara evidencia que muestre limitación de la testa para el ingreso de agua a la semilla. Los resultados indican que existe un efecto de la testa y la temperatura sobre el incremento en peso fresco y la duración de las fases I y II. La toma rápida de agua, típica de la fase I fue tuvo una menor duración en las semillas sin testa. La eliminación de testas causó un mayor % de incremento en peso seco, una disminución en la longitud de la fase I y una

mayor velocidad en la toma de agua. Así mismo, la temperatura de imbibición de 35°C, causó también una importante disminución de la duración de la fase I. Sin embargo, la menor duración de la fase I (Tabla 3-7) en semillas sin este tejido solo indica que el efecto de la testa, estuvo relacionado con las tasas de toma de agua, en donde la permeabilidad juega un papel relevante en cuanto a la protección del embrión. Si la velocidad de penetración del agua es muy rápida, las semillas pueden sufrir daño por excesiva imbibición y si es muy lenta la germinación se retrasa y se pierde viabilidad (Bewley y Black 1994). Frente a esto Matthews *et al.* (1980), indicaron que la testa claramente es una barrera para la absorción de agua en leguminosas, la cual sirve para proteger al embrión seco del efecto de daño causado por una rápida absorción de agua, un rol de un considerable valor adaptativo.

La longitud de cada fase de toma de agua depende tanto de ciertas propiedades inherentes de las semillas (contenido de substratos hidratables, permeabilidad de la cubierta de las semillas, absorción de oxígeno, tamaño de la semilla, etc.) como de la condición de temperatura durante la exposición al agua (Bewley y Black 1983). Esta última influencia de gran manera la permeabilidad de la testa (Bewley y Black 1994).

Adicionalmente ninguno de los métodos de eliminación parcial de la testa (lija distal y cortes apical distal, apical proximal y ventral) mejoraron la germinación en semillas de *A. squamosa* L, pues ninguno presentó valores superiores de PG y VMG, así como menor TMG, a los generados por efecto de la eliminación completa de la testa. Adicionalmente, en las semillas provenientes del Tolima, la eliminación total de la testa contribuyó sustancialmente al incremento del PG en comparación con el testigo y los demás tratamientos.

Los resultados en el estudio relacionado con la identificación de latencia física en semillas de anón y la comparación con estudios realizados en la misma especie, demuestran que no hay impedimento de la testa sobre la absorción de agua, pese a la apariencia rígida de estas. El efecto está relacionado con la duración de las fases de imbibición, en donde, como se observa en las figuras 3-8 y 3-9, la testa actúa como un regulador del ingreso de agua, esto fue muy evidente en la fase I de imbibición. Adicionalmente, la evidencia histológica revela que en el plug micropilar se observa un menor apiñamiento de fibras (braquiescleridas y macroescleridas) y formación de un tejido poco denso (aerénquima), que puede ser permeable al ingreso de agua.

Por lo anterior, es posible concluir que las testas de *A. squamosa* L. no presentan un impedimento a la absorción de agua, funcionando como un tejido de regulación de la hidratación de la semilla. A la misma conclusión Ferreira *et al.* (1997) verificaron que las semillas de *Annona squamosa* y las del híbrido interespecífico Atemoya, *Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L., no presentaban impedimentos físicos a la entrada

del agua, lo cual los condujo a descartar la presencia de impermeabilidad en la testa de las unidades de propagación.

Los resultados indican que es posible la presencia de latencia morfofisiológica en las semillas de *A. squamosa* L. En este tipo de latencia, adicional al embrión rudimentario, un mecanismo fisiológico inhibe la germinación de la semilla (Baskin y Baskin, 2001, Baskin y Baskin, 2004). En *Annona squamosa* L. es característica la presencia de un embrión rudimentario, poco desarrollado pero diferenciado, lo cual se soporta en la evidencia histológica. Adicionalmente, se ha señalado que las semillas de Annonaceae al ser dispersadas presentan un embrión pequeño, considerado poco desarrollado e inmaduro Noorman (1992). Según Hayat (1963) el embrión de *A. squamosa* L. incrustado en un abundante endospermo tiene una tasa lenta de crecimiento, lo que hace que la semilla tarde de 1 a 3 meses en germinar, esto podría indicar la presencia de latencia morfológica tal y como es indicado por (Baskin y Baskin, 2004), sin embargo, en nuestros resultados se observa un claro factor fisiológico del fenómeno de latencia, lo cual, según Baskin y Baskin, (2001) es posible constatar si hay un incremento en el porcentaje de un periodo de estratificación caliente o después de la exposición a GA₃ (Baskin y Baskin, 2001).

Los resultados de la estratificación caliente (25°C) húmeda durante los tres periodos de evaluación (15, 30 y 45 días) (Figura 3-15) no ofrecieron una adecuada evidencia para identificar si existe un componente fisiológico en la latencia de semillas de *A. squamosa* L. esto se debe a que no hubo un efecto positivo sobre el rompimiento de latencia del tratamiento de estratificación húmeda caliente sobre las semillas provenientes de las dos localidades. Pese a que en las semillas provenientes del Tolima las variables VMG, TMG y E presentaron mejores valores que el control, los resultados del PG muestran el efecto negativo de este procedimiento. Esta respuesta puede estar relacionada con la temperatura empleada en el proceso (25°C), la cual puede ser más alta si se tiene en cuenta que el anón proviene de zonas cálidas tropicales bajas, ante lo cual Baskin y Baskin (2001), indican que la temperatura óptima para el crecimiento de los embriones, esta entre rangos de temperatura de 15 a 30 °C. Es posible que también se haya presentado inducción de latencia secundaria por temperaturas inadecuadas. Según Bewley y Black (1994) la latencia secundaria ocurre al ser sometidas las semillas maduras, después de su dispersión, a condiciones ambientales que inducen este estado, esta puede presentarse luego de la maduración de las semillas o aún en semillas con embriones no completamente desarrollados (Foley, 2001). Sin embargo, en un estudio llevado a cabo por Moreno (2011), al evaluar el efecto de la estratificación húmeda fría (8°C), y la estratificación húmeda fría seguida de estratificación húmeda caliente (25°C) durante 15, 30 y 45 días, se encontró que la estratificación húmeda fría por 45 días y periodos de 30 días alternados entre estratificación húmeda fría y estratificación húmeda caliente incrementaron significativamente los porcentajes de germinación (65,6% y 45,6% respectivamente) y la velocidad media de germinación (1,28 y 1,32 semillas germinadas/día, respectivamente) en comparación con el control (PG = 23,2% y VMG = 0,56 semillas germinadas/día), lo que podría indicar la presencia de latencia

morfofisiológica. Según Chien (1998) la estratificación fría promueve el crecimiento del embrión, reduce la sensibilidad y el contenido de ácido abscísico (ABA) y simultáneamente incrementa la concentración y sensibilidad de las semillas al ácido giberélico (GA_3) lo que resulta en la superación de la latencia morfofisiológica (Bewley y Black, 1994).

El factor fisiológico de la latencia morfofisiológica tiene un componente embrionario y un componente de cubierta seminal (testa, endospermo, pericarpo) y su interacción determina la profundidad de la latencia (profunda, intermedia, no profunda). La latencia del embrión se caracteriza por un bajo potencial ó inhibición de su crecimiento y elongación debido a una alta relación ABA/ GA_3 , lo que lo inhabilita para romper las estructuras de cubierta. Por su parte la latencia de la cubierta seminal se manifiesta como una resistencia mecánica de la testa y el endospermo al crecimiento del embrión (Finch-Savage y Leubener-Metzger, 2006) o como una latencia química debida a la presencia de compuestos inhibidores en las capas y cubiertas de la semilla (Baskin y Baskin, 2004) por ejemplo, por la presencia de inhibidores fenólicos (Selle *et al.*, 1983).

Con relación a lo anterior, los resultados presentados en la figura 11, muestran una mejor respuesta de las variables cuando fueron eliminadas las testas, en contraste el rompimiento parcial del integumento mediante métodos de escarificación no mejora la germinación de las semillas, lo que indica que es posible que exista un efecto inhibitor de las testa sobre la germinación de las semillas de *A. squamosa* L. el cual se puede deber a la llamada latencia de la cubierta seminal, componente de la latencia fisiológica.

Las respuestas positivas en cuanto al uso del Acido giberélico en este estudio están de acuerdo con lo reportado por Weaver (1987), Taiz y Zeiger (1991), Salisbury y Ross (1992) y Kigel y Galili (1995) y son indicativos de un componente fisiológico de la latencia morfofisiologica. Los resultados presentados muestran un efecto importante de la aplicación de GA_3 exógeno, siendo este tratamiento muy efectivo para el rompimiento de latencia de las semillas de *A. squamosa* L. Es posible observar una gran sensibilidad de las semillas a la aplicación de este fitoregulador, ya que, con la aplicación de cualquier dosis evaluada se observaron respuestas de mejora en las variables, lo que indica que el fenómeno de latencia en estas semillas puede ser el resultado del balance hormonal entre promotores de inhibidores de crecimiento Weaver (1987) y su rompimiento puede efectuarse por el cambio en el balance hormonal en donde el ácido giberélico actúa en la promoción de la germinación Kigel y Galili (1995).

Con respecto a los patrones de germinación, el tratamiento de GA_3 sobre las semillas incrementó los PG en cada punto del tiempo de incubación, como efecto de grandes incrementos en las tasas de germinación iniciales y menores tiempos en alcanzar la máxima carga de PG, lo cual fue más acentuado y tuvo más influencia en las semillas provenientes del Tolima. Aunque todas las concentraciones de GA_3 aplicadas mediante

imbibición promueven y mejoran el potencial de germinación en las semillas, en comparación con la no aplicación, es posible destacar el comportamiento de las semillas cuando fueron tratadas con 600 mg/kg. Con esta concentración las semillas tardaron un menor tiempo en alcanzar la carga máxima del PG, así mismo, generaron un menor tiempo de crecimiento acelerado y en consecuencia presentaron los más altos PG en los 5 primeros días de incubación. Así mismo la concentración de 600 mg/kg de GA₃ generó las mejores respuestas de PG, TMG, VMG y E para las semillas de Castilla loo mismo que para las de Apulo.

Como se ha mencionado, una de las características de las semillas de anonáceas es la presencia de un embrión rudimentario y de desarrollo lento, no desarrollado aún cuando el fruto está maduro. En ese estado permanece incluso después de extraídas las semillas (Sanewski, 1991; Smet *et al.*, 1999). La respuesta positiva de la aplicación de giberelinas se debe a su efecto sobre el crecimiento del embrión. Las giberelinas pueden ser requeridas en la activación del crecimiento embrionario y en el debilitamiento del tejido endospermático que rodea el embrión y restringe su crecimiento. (Bewley, 1997; Bradford *et al.*, 2000; Hegashi *et al.*, 2002; Taiz y Zeiger, 2006). Durante la germinación el embrión sintetiza y libera GA₃ lo que promueve la producción de varias enzimas hidrolíticas involucradas en la solubilización de reservas, entre los cuales esta las α y β -amilasas (Taiz y Zeiger, 2006). Las α y β -amilasas digieren las reservas almacenadas en el endospermo formando azúcares, aminoácidos y ácidos nucleicos que son absorbidos y transportados a las regiones de crecimiento del embrión, estimulando su elongación celular y promoviendo la ruptura del tegumento de la semillas por la radícula acelerando así la germinación con mayor uniformidad (Hopkins, 1999). Así mismo, muchas de las enzimas relacionadas en el proceso de germinación, como lipasas, proteinasas, fosfatasas e hidrolasas, son reguladas o activadas por reguladores vegetales como las giberelinas (Arteca, 1995).

Las respuestas positivas a la aplicación de ácido giberélico y a la eliminación de testas son una evidencia valiosa que permite evidenciar el componente fisiológico de la latencia morfofisiológica. Por un lado, es posible que al eliminar las testas se haya liberado la resistencia mecánica impuesta contra el embrión, lo que permitió su crecimiento, aun con el bajo potencial y tasas de crecimiento. Por otro lado, la aplicación de giberelinas incrementó el potencial y tasas de crecimiento el embrión, además de debilitar el endospermo, lo que contribuyó a facilitar la protrusión de la radícula a través de la cubierta seminal.

Los resultados encontrados en el presente estudio y lo reportado por Moreno (2011) soportan firmemente la hipótesis de que las semillas de *A. squamosa* L. presentan características de una latencia morfofisiologica compleja no profunda de acuerdo con la clasificación de latencia de Baskin and Baskin (2004).

La diferencia de las respuestas a los tratamientos entre localidades puede deberse a que las respuestas de las plantas a los fitoreguladores dependen de muchos factores, dentro

de ellos genéticos y ambientales, los cuales influyen el nivel endógeno de las hormonas y de sustancias antagónicas (Agustí y Almela, 1991). Adicionalmente, la profundidad de la latencia primaria está fuertemente relacionada con el estatus nutricional de la planta madre (Geneve, 2003; El-Keblawy y Al-Rawai, 2006) y las condiciones ambientales reinantes durante el desarrollo de la semilla (Finch-Savage y Leubener-Metzger, 2006) estas condiciones influyen fuertemente la relación y los ácido abscísico/giberélico en la última fase de maduración seminal (Gutierrez *et al.*, 2007) y de esto depende la inducción de la latencia. Las semillas provenientes de Cundinamarca provienen de Apulo, a una altura de 635 msnm, una temperatura media anual de 24,72 °C, un brillo solar promedio mensual de 118,8 horas y una precipitación anual de 1146 mm, mientras que las semillas provenientes del Tolima se colectaron en una región mas baja, a 447 msnm en donde la temperatura media anual es de 28,22°C, el brillo solar mensual promedio es de 183,23 horas y la precipitación promedio anual es de 1732 mm. Las diferencias de hábitat de donde proviene el material puede influenciar la respuesta de las semillas de la misma especie a los tratamientos (Nikolaeva, 2004).

4. Efecto del almacenamiento sobre la germinación, contenido de proteína y carbohidratos solubles en semillas de anón (*Annona squamosa* L.) (Annonaceae)

El anón (*Annona squamosa* L.) es un frutal tropical perteneciente a la familia de las anonáceas, presenta 140 géneros y 2.500 especies. En Colombia el anón (*A. squamosa* L) se cultiva principalmente en la Costa Atlántica y en las zonas secas de los valles interandinos, en los departamentos de Valle, Caldas, Huila, Tolima, Cundinamarca, Meta y los Santanderes, entre los 450 y 1.500 msnm (Guerrero y Fischer, 2007). La dinámica comercial del anón en Colombia se da como venta de la fruta fresca en los lugares donde se produce (Guerrero y Fischer, 2007). En Apulo, uno de los municipios de mayor producción en Colombia y en los demás municipios productores, los campesinos venden el anón (*A. squamosa* L) en cajas de madera a intermediarios, los cuales las revenden en las principales ciudades del país y una vez allí, el anón es distribuido a granel (Guerrero y Fischer, 2007).

En Colombia el manejo del cultivo es muy deficiente, presentando problemas en poda, propagación (que se da solamente por semillas), fertilización, polinización, manejo de problemas fitosanitarios, desconocimiento de los índices de madurez y mal manejo poscosecha (Guerrero y Fischer, 2007).

La propagación es principalmente vía sexual. Sus semillas presentan una germinación errática, lo cual ocasiona que la reproducción sexual se dificulte (Pinto y Genú, 1984). La reproducción sexual, presenta varias desventajas tales como la alta variabilidad genética, el inicio tardío de la cosecha y un aumento en el vigor de las plantas, lo que en ocasiones dificulta su manejo (Morton, 1987; Cruz, 2002).

Un proceso importante de la producción de semillas es el almacenamiento, este procedimiento permite que los productores puedan guardar las semillas de una temporada a otra. De otra parte, con la existencia de los bancos de germoplasma, uno de sus objetivos es mantener la viabilidad de las semillas de una amplia gama de especies y por un tiempo indeterminado (en muchos casos a largo plazo, considerado como de 10 a 100 años o más) (Hong y Ellis, 1996). La longevidad de las semillas (es decir, el período de supervivencia) varía mucho entre las especies, esta longevidad esta también condicionada por el medio ambiente predominante durante la formación del fruto la

maduración de la semilla, y en el manejo que se le dé a la semilla una vez recolectada (Hong y Ellis, 1996).

El efecto del almacenamiento sobre la fisiología de las semillas está relacionado con el lugar, el acondicionamiento de la semilla, condiciones ambientales y período (Catunda *et al.*, 2003; Santana y Cavalho, 2006), por lo tanto, el conocimiento del efecto del almacenamiento sobre la fisiología de las semillas es importante para el mantenimiento de bancos de germoplasma y de esta forma puede contribuir a la propagación y conservación de las especies (Pereira *et al.*, 2008).

Durante el almacenamiento de las semillas, ocurren alteraciones que resultan en el deterioro de las semillas, como agotamiento de reservas destinadas a suministrar energía para el crecimiento del embrión (Villela y Peres, 2004). Este hecho fue observado por Veiga *et al.* (2007) en trabajos con *Coffea arabica* L. en donde fue posible observar mayor actividad de la enzima endo beta mananasa durante el almacenamiento de estas semillas.

Una de las manifestaciones finales de las alteraciones químicas y fisiológicas que ocurren durante el deterioro de las semillas es la pérdida o disminución de la capacidad germinativa (Toledo y Filho, 1977). Por esta razón, para el almacenamiento comercial de semillas o para el establecimiento de bancos de germoplasma, además de conocer las condiciones óptimas del almacenamiento, es importante conocer la capacidad de germinación de las mismas (Oliveira *et al.*, 1984).

Las condiciones de almacenamiento que mantienen la viabilidad de las semillas son aquellas que reducen la respiración y otros procesos metabólicos sin dañar el embrión. La temperatura es tal vez el factor ambiental más importante que regula la germinación y controla el crecimiento posterior de las plántulas (Hartmann y Kester, 1975; Cardona *et al.*, 2005). Es por esto que, la viabilidad y el vigor, durante el almacenamiento, declinan rápidamente a altas temperaturas y en menor proporción con temperaturas bajas. La reducción de la temperatura que influencia las actividades metabólicas de las semillas, resulta en el favorecimiento de las condiciones de almacenamiento y por lo tanto de la conservación de su calidad (Toledo y Filho, 1977).

El aumento de la HR y de la temperatura, asociados con el tiempo de almacenamiento de la semilla, conducen a una disminución progresiva del vigor de las semillas en razón del deterioro ocasionado por la pérdida de la integridad de las membranas (Delouche y Baskin, 1973; Delouche *et al.*, 2002). La HR ejerce influencia sobre el contenido de humedad de la semilla y su efecto es directo sobre su longevidad. Al respecto, Powell y Matthews (1981) expresan que el envejecimiento de las semillas ocurre mucho más rápido cuando estas presentan alto contenido de humedad y son almacenadas a temperatura alta, pues se afectan los procesos bioquímicos (Popinigis, 1985; Aguiar y

Figliolia, 1993). Santos *et al.* (2005) estudiaron las modificaciones fisiológicas y bioquímicas en cinco cultivares de frijol durante ocho meses bajo condiciones ambientales no controladas y reportaron que en cuatro de ellos se registró reducción del vigor y la germinación a causa del deterioro de las membranas celulares, que redundó en la pérdida de la capacidad de retención de solutos, lo que se considera como el primer paso hacia el deterioro de la calidad fisiológica de la semilla.

La técnica más adecuada para el almacenamiento de las semillas, es en cámara seca con temperatura baja y en atmósfera controlada, sin embargo, algunas especies presentan exigencias de almacenamiento diferentes a aquellas que requieren baja temperatura y humedad (Scalon *et al.*, 2004). Para algunas especies como *Dovyalis caffra* el ambiente de almacenamiento es indiferente para el mantenimiento de la viabilidad del lote de semillas, siendo apenas significativo el tiempo en las semillas permanecen almacenadas (Oliveira *et al.*, 2006).

Las semillas ortodoxas toleran una deshidratación hasta de 5% en el contenido de humedad; por su parte, las semillas que toleran la deshidratación entre 10% y 12,5% de contenido de humedad se consideran intermedias y las que toleran la deshidratación entre 15% y 50% de humedad se denominan recalcitrantes (Farrant *et al.*, 1993; Gentil, 2001). En anonáceas Lobo *et al.* (2007), nos muestran que las semilla de chirimoya y guanábana presentan una condición de almacenamiento ortodoxa. Según Villela y Peres (2004) las semillas ortodoxas pueden ser almacenadas a bajas temperaturas, pues pueden resistir condiciones de adversidad durante el período de latencia, al ser expuestas a condiciones de humedad y temperatura adecuadas retoman su desarrollo y completan el proceso de germinación.

Se ha mencionado que los carbohidratos solubles juegan un papel clave en la tolerancia a la desecación y almacenamiento de las semillas. Incrementos en los niveles de sacarosa y particularmente en la familia de oligosacáridos de la rafinosa han sido correlacionados con la tolerancia a la desecación durante el desarrollo de las semillas ortodoxas (Chen y Burris, 1990; Leprince, Bronchart y Deltour, 1990; Blackman, Obendorf y Leopold, 1992). Así mismo la longevidad de las semillas ortodoxas se ha correlacionado positivamente con el nivel de estos azúcares (Horbowicz y Obendorf, 1994). Estos disacáridos (trehalosa y sacarosa) y oligosacáridos (rafinosa) han sido implicados en la estabilización de membranas (Buitink *et al.*, 2000) y en la formación de vidrio (vitrificación) en las células de las semillas durante el secado (Blackman *et al.*, 1992; Sun *et al.*, 1994). Altas concentraciones de oligosacáridos y la formación de la fase vítrea viscosa demora la cristalización de solutos, inhibe la movilidad molecular y restringe las reacciones bioquímicas (Koster, 1991) previniendo así el deterioro de estructuras macromoleculares durante la deshidratación. Según Crowe *et al.* (1998), los azúcares también pueden contribuir a estabilizar las estructuras de las proteínas al formarse enlaces de hidrógeno entre grupos de hidroxilo de carbohidratos y residuos polares en proteínas de membrana.

En cada especie y, en algunos casos, para diferentes variedades pueden presentarse necesidades específicas para su conservación, por lo que resulta importante determinar las condiciones óptimas en cada caso particular. En el caso de las semillas ortodoxas, las condiciones de almacenamiento que se deben considerar son básicamente la humedad de la semilla y la humedad y temperatura ambientes (Herrera y Alizaga, 2009). En el presente estudio se busca establecer el efecto del almacenamiento sobre la germinación, contenido de proteína y carbohidratos solubles en semillas de anón (*Annona squamosa* L.) procedentes de dos zonas geográficas de Colombia.

4.1 Metodología

Esta investigación se realizó en los laboratorios de Fisiología Vegetal y de Recursos Genéticos, de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. La determinación de proteína y carbohidratos solubles fueron realizadas en el laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal del departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

Selección de material vegetal

El material seleccionado hace parte de las accesiones colectadas dentro del proyecto del Banco Colombiano de Germoplasma de Anón que hace parte del programa: Material de Siembra y Mejoramiento Genético del Anón (*Annona squamosa* L.). Durante el desarrollo del proyecto se realizaron expediciones de colecta de material en todo el país. La selección de los materiales a emplear en el estudio se realizó buscando accesiones contrastantes, basado en los valores de descriptores de caracterización morfo - agronómica tomados en campo y en laboratorio, así como a la tradición en la producción de la especie. De todas las zonas visitadas se seleccionaron las accesiones colectadas el municipio de Apúlo, (Cundinamarca) y Castilla, (Tolima) debido a que los individuos se encuentran distribuidos en agroecosistemas y no en solares o de forma espontánea en jardines. En particular se destaca la potencialidad frutícola del municipio de Apulo como principal productor nacional (Centre for Underutilised Crops, 2002) de anón, lo cual se debe a la calidad intrínseca que alcanza el fruto (alto contenido de azúcares) en el ecosistema bosque seco tropical.

Material vegetal y manejo del sustrato

Las semillas se obtuvieron a partir de frutos maduros y blandos al tacto, se lavaron con agua a temperatura ambiente para remover hongos tierra o cualquier residuo presente en su superficie. Luego se separó la corteza (pericarpio) de la pulpa (mesocarpio) y se retiró manualmente la semilla de la pulpa y el arilo; posteriormente, se lavaron y se colocaron en toallas de papel absorbente durante tres días a temperatura ambiente con el fin de secarlas. Las semillas se desinfectaron con inmersión en Hipoclorito al 1% durante 9 minutos, lavado con agua destilada y etanol al 96% por tres veces, finalmente, se realizó

por tres veces una limpieza con agua destilada para retirar residuos de etanol que pudieran quedar en la semilla.

Inicialmente, se determinó el sustrato de germinación: papel filtro y turba rubia Klassman[®], encontrando que no hubo germinación alguna en papel filtro. Con el fin de evitar la presencia de hongos o bacterias se desinfectó tanto la turba como las semillas usadas en el desarrollo del ensayo. La desinfección de la turba se realizó con Benomyl (1 g/L) y Vitavax (2 g/L).

Condiciones de almacenamiento

Las semillas de las accesiones de Apulo, Cundinamarca se almacenaron con una humedad entre el 10 y 12%, las semillas provenientes de Castilla Tolima con una humedad entre el 12 y 14%, durante 30, 60 y 120 días en bolsas de papel craft en 3 condiciones de almacenamiento: en cuarto frío (CF) de la Facultad de Agronomía a 4°C y HR= 99%; en refrigerador (R) a 10 °C y HR= 99% y en la condición ambiental (CA) a 18,7°C y HR= 59,5 % condiciones predominantes en el laboratorio de Recursos Genéticos de la Facultad de Agronomía, Bogotá, Colombia. El tiempo, la condición de almacenamiento y la localidad se organizaron en un arreglo factorial de 3x3x2 con cuatro repeticiones para un total de 18 tratamientos.

Germinación

Las semillas fueron sembradas en sustrato turba rubia Klasmann[®] sin nutrientes a una profundidad equivalente al doble de su longitud y colocadas posteriormente en un fitotrón Conviron CMP3244 durante 30 días a una temperatura de 35 °C, en ausencia total de luz, ya que, las semillas de *Annona squamosa* L. son indiferentes a las condiciones de luz (Ferreira *et al.*, 1997). En cada periodo de almacenamiento las semillas se retiraron para evaluar su germinación. Se realizaron observaciones cada 5 días durante 30 días, ya que, las semillas que germinan después de este período pueden considerarse latentes (Baskin y Baskin, 2001). Se registraron como semillas germinadas aquellas en las que hubo protrusión de la radícula.

Con los datos del muestreo en el tiempo se calculó el porcentaje de germinación (PG), tiempo medio de germinación (TMG) y velocidad media de germinación (VMG) siguiendo las ecuaciones presentadas en la tabla 4-1.

Tabla 4-1. Fórmulas empleadas para el cálculo de variables de germinación. Ranal y Santana (2006).

Variable	Ecuación	unidad
PG	$\left(\frac{N}{N_s} \right) * 100$	%
VMG	$\sum_{i=1}^k n_i / t_i$	Semillas germinadas / día
TMG	$\sum_{i=1}^k n_i t_i / \sum_{i=1}^k n_i$	días

n_i = número de semillas germinadas en la i ésima toma de datos

t_i = tiempo (en días) de la i ésima toma de datos

K = Tiempo (en días) de duración de la prueba de germinación

N = número de semillas germinadas

N_s = número de semillas totales

Contenidos de Proteína

En cada período de almacenamiento las semillas se retiraron para evaluar su contenido de proteína soluble. La determinación se realizó con base en las metodologías descritas por Bradford (1976) y Zor y Selinger (1996). En una microplaca por triplicado se agregaron 1 μ L de extracto enzimático que corresponde a los tiempos de almacenamiento, 24 μ L de agua destilada y 200 μ L de reactivo Bradford. La microplaca se puso en agitación por cinco minutos y luego se puso en el Lector de placas iMark de Biorad para lectura de absorbancia a 590nm. Con el fin de obtener una curva de calibración, en otra microplaca, se pusieron 25 μ L de albúmina sérica bovina (BSA) tanto en el primero como en el segundo pozo, al segundo pozo se le agregaron 25 μ L de PBS y se mezcló bien con la micropipeta, luego, se extrajeron 25 μ L de la solución de ese pozo. Este proceso se repitió otras cinco veces para tener al final 7 pozos con el mismo volumen (25 μ L) y la mitad de la concentración de BSA del pozo anterior. Esto se hizo por triplicado. La microplaca se puso en el Lector de placas iMark de Biorad y se midió la absorbancia a 590nm. Al final se calculó la cantidad de BSA presente en cada pozo y se realizó una curva de μ g de BSA (eje x) contra absorbancia a 590nm (eje y). Al final, por regresión lineal se halló la ecuación de la recta y se despejó x, que indica la cantidad de proteína y se reemplazó por los valores de absorbancia determinados en el paso anterior, de esta forma se definió la cantidad de PVPP con la cual se obtuvo una mayor cantidad de proteína y la cantidad de proteína en las muestras.

Carbohidratos solubles

La determinación de carbohidratos solubles se realizó en semillas de la localidad de Castilla (Tolima), en dos periodos de almacenamiento con respuestas contrastantes en términos de germinación (0 y 120 días).

Para determinar el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa se tomaron 100 mg de semillas maceradas en nitrógeno líquido las cuales, seguidamente fueron puestas en tubos de reacción de 2 mL a los que se les agregó 1 mL de etanol al 80% a 90°C, posteriormente, se centrifugó 10 minutos a 6000 rpm a 20°C y se extrajo el sobrenadante. El pellet se resuspendió dos veces más con 1 mL de etanol al 80% a 90°C siguiendo el mismo proceso hasta obtener 3 mL de sobrenadante. El sobrenadante fue llevado a secado en un Speed Vac obteniendo un concentrado en polvo el cual fue resuspendido en 1 mL de agua destilada. El extracto concentrado fue centrifugado de nuevo a 6000 rpm durante 15 minutos y filtrado en un filtro de 0,45 µm. Las muestras fueron analizadas en un HPLC WATERS con una columna Phenomenex Ca⁺⁺ Monosacharide de 30cm X 8mm, con autosampler, horno y detector de índice de refracción. La fase móvil fue agua tipo I. El horno estuvo a una temperatura de 85°C y el detector a 44°C. Los datos fueron interpolados con la curva de calibración empleando como estándar sacarosa, glucosa y fructosa en 1,00 mg/mL. Finalmente, los datos se expresaron en mg de carbohidrato/g peso fresco.

Análisis de datos

Se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas con ayuda del paquete estadístico SAS, los datos que no presentaron normalidad en los residuales fueron transformados con la función $\sqrt{(PG/100)}$, usualmente utilizada en estudios de germinación (Wagner *et al.*, 2006). Se realizó un ANAVA y las diferencias entre los tratamientos se determinaron mediante prueba de Tukey (P<0,05). Se usó el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System), versión 9.1.

4.2 Resultados

Humedad de las semillas durante el almacenamiento

En las semillas obtenidas de Apulo, la humedad inicial fue de 10,86%, la cual no presentó grandes variaciones cuando las semillas fueron almacenadas en CA. El almacenamiento en cuarto frío (CF) y en refrigerador (R), generó fluctuaciones en el contenido de humedad, incrementándose en los 30 y 120 días. En las semillas provenientes de Castilla la humedad inicial fue de 15,16%, la cual se vio disminuida en las tres condiciones de almacenamiento a los 30 días, siendo mayor la disminución para las semillas almacenadas a condición ambiente (CA). En los 60 y 120 días las semillas almacenadas en CA mantuvieron un contenido de humedad estable alrededor del 11%. Las semillas

almacenadas en CF mantuvieron una humedad de 14 y 15% y las almacenadas en R en 13 y 14% (Figura 4-1).

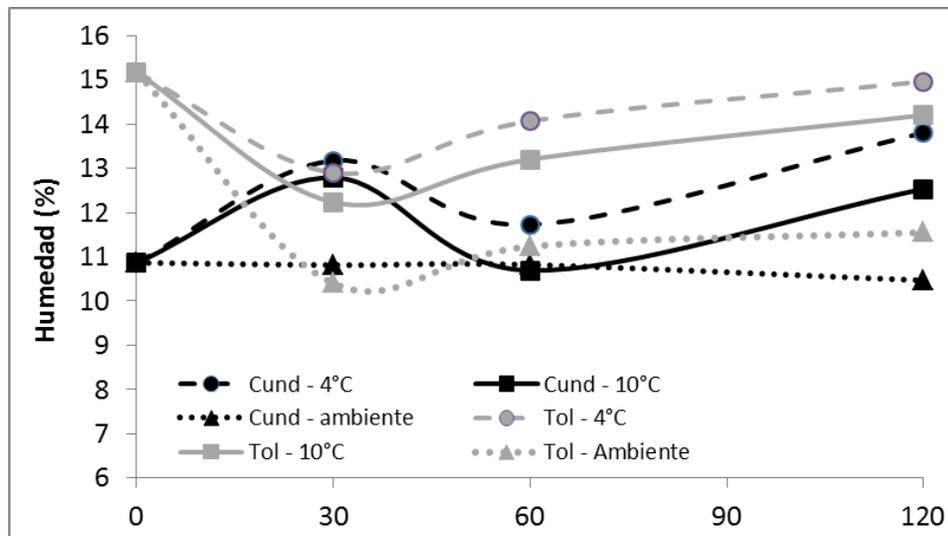


Figura 4-1. Cambios en el contenido de humedad de semillas de *A. squamosa* L. provenientes de Castilla (Tolima) (líneas grises) y Apulo (Cundinamarca) (líneas negras) almacenadas durante cuatro periodos a temperatura ambiente (puntos continuos), 4°C (líneas intermitentes) y 10°C (líneas continuas).

Germinación y contenido de proteína durante el almacenamiento de las semillas

Para las semillas de las dos localidades hubo efectos altamente significativos ($P \leq 0,001$) de condición de almacenamiento sobre el porcentaje de germinación (PG), la velocidad de germinación (VMG), el tiempo medio de germinación (TMG) y el contenido de proteína. La localidad y la interacción entre localidad y tratamientos no tuvieron efectos sobre las variables.

En las semillas de *Annona squamosa* L. provenientes de las dos localidades los PG obtenidos con el almacenamiento en CA fueron significativamente mayores a los obtenidos en CF y R durante los tres periodos de tiempo evaluados. En las semillas provenientes de Castilla en CA los PG encontrados durante 60 y 120 días de almacenamiento (85 y 80% respectivamente) fueron significativamente mayores a los observados con 0 y 30 días de almacenamiento (28 y 69,3 % respectivamente). En refrigerador (R) los valores del PG permanecen constantes durante 0, 30 y 60 días de almacenamiento y solo a 120 días se observa un incremento en su valor (PG= 40%). Por otro lado en las semillas provenientes de Apulo almacenadas en condición ambiental (CA) durante 60 y 120 días, presentaron un PG significativamente más alto (85,3% para ambos) que los encontrados para semillas sin almacenar (61,3 %), almacenadas por 30 (56%). Los PG observados con el almacenamiento en CF y R tuvieron valores similares

durante todo el período de almacenamiento de las semillas, sin embargo, se observa una tendencia al incremento cuando se almacenan por 120 días a 10°C (Figura 4-2A).

Las semillas obtenidas de Castilla y mostraron cambios significativos en la VMG durante el tiempo de almacenamiento, obteniéndose los valores más altos con 60 días de almacenamiento y con tendencia a la disminución del valor con 120 días. El valor máximo de la VMG se obtiene con almacenamiento en CA durante 60 días (0,17 semillas germinadas/día) siendo este 3,3 veces mayor que el VMG de semillas sin almacenar (0,05 semillas germinadas/día). En las semillas obtenidas de Apulo, durante el almacenamiento en CA y CF se observaron cambios significativos en la VMG durante el tiempo de almacenamiento, sin embargo, a diferencia de las semillas provenientes de Castilla, El valor más alto de VMG (0,18 semillas germinadas/día) se obtuvo con el almacenamiento en CA durante 120 días, valor 3 veces mayor al encontrado para las semillas sin almacenar (0,06 semillas germinadas/día). Un valor alto también fue generado con las semillas almacenadas en CF a los 120 días en Castilla (0,17 semillas germinadas/día) y a los 60 y 120 días en Apulo (0,14 y 0,13 semillas germinadas/día respectivamente).

Con el almacenamiento en R durante 60 días también se observó a los 120 días se observó una disminución significativa en el valor esta variable para semillas de Castilla (0,10 semillas germinadas/día) y Apulo (0,08 semillas germinadas/día) (Figura 4-2B).

En las semillas provenientes de Castilla los valores significativamente más bajos de TMG se obtuvieron con el almacenamiento durante 60 y 120 días en CA (5,9 y 6,3 días) en comparación con semillas sin almacenar (19,4 días), sin embargo en este mismo periodo se obtiene valores similares en CF (7 días) y R (6,3 días). A los 120 las semillas almacenadas en CF y R incrementaron su TMG (8,3 y 9,9 días).

En las semillas obtenidas de Apulo, los tratamientos presentaron variación significativa en el tiempo, con tendencia a disminuir a medida que avanzó el almacenamiento con excepción del almacenamiento en refrigerador (R) el cual presentó un incremento del TMG a los 60 días de almacenamiento. En comparación con las semillas sin almacenar (17 días) el valor más bajo de TMG se presentó para las semillas almacenadas por 60 y 120 días en CA (6,8 y 5,7 días) aunque este valor no difirió significativamente del encontrado en 60 días de almacenamiento en CF (6,1 días) y R (6,1 días) (Figura 4-2C).

Los contenidos de proteína en semillas sin almacenar de ambas localidades presentaron valores similares: 9,61 mg/g para las provenientes de Castilla y 9,92 para las obtenidas de accesiones de Apulo.

En las semillas obtenidas de Castilla, en comparación con las semillas sin almacenar (9,61 mg/g), el contenido de proteína decayó a los 60 días, presentando valores de 5,21 mg/g (CA), 5,62 mg/g (CF) y 5,79 mg/g (R). A los 30 días se observó un incremento significativo del contenido de proteína en semillas almacenadas en CA (11,80 mg/g)

mientras que las semillas almacenadas en refrigerador el contenido de proteína tendió a disminuir a medida que avanzo el periodo de almacenamiento.

En las semillas provenientes de Cundinamarca y almacenadas en R presentaron a los 30 días un incremento significativo del contenido de proteína (13,25 mg/g) en comparación con las semillas sin almacenar (9,92 mg/g). Posteriormente su contenido se disminuye a los 60 y 120 días de almacenamiento (7,50 y 7,52 mg/g). Con el almacenamiento a condición ambiente (CA) y en cuarto frío (CF) los niveles de proteína a los 30 y 60 días permanecieron constantes con respecto a las semillas sin almacenar. Sin embargo, con 120 días de almacenamiento los contenidos de proteína se disminuyen significativamente tanto para las semillas en CA (5,36 mg/g) como para las almacenadas en CF (5,90 mg/g) (Figura 4-2D).

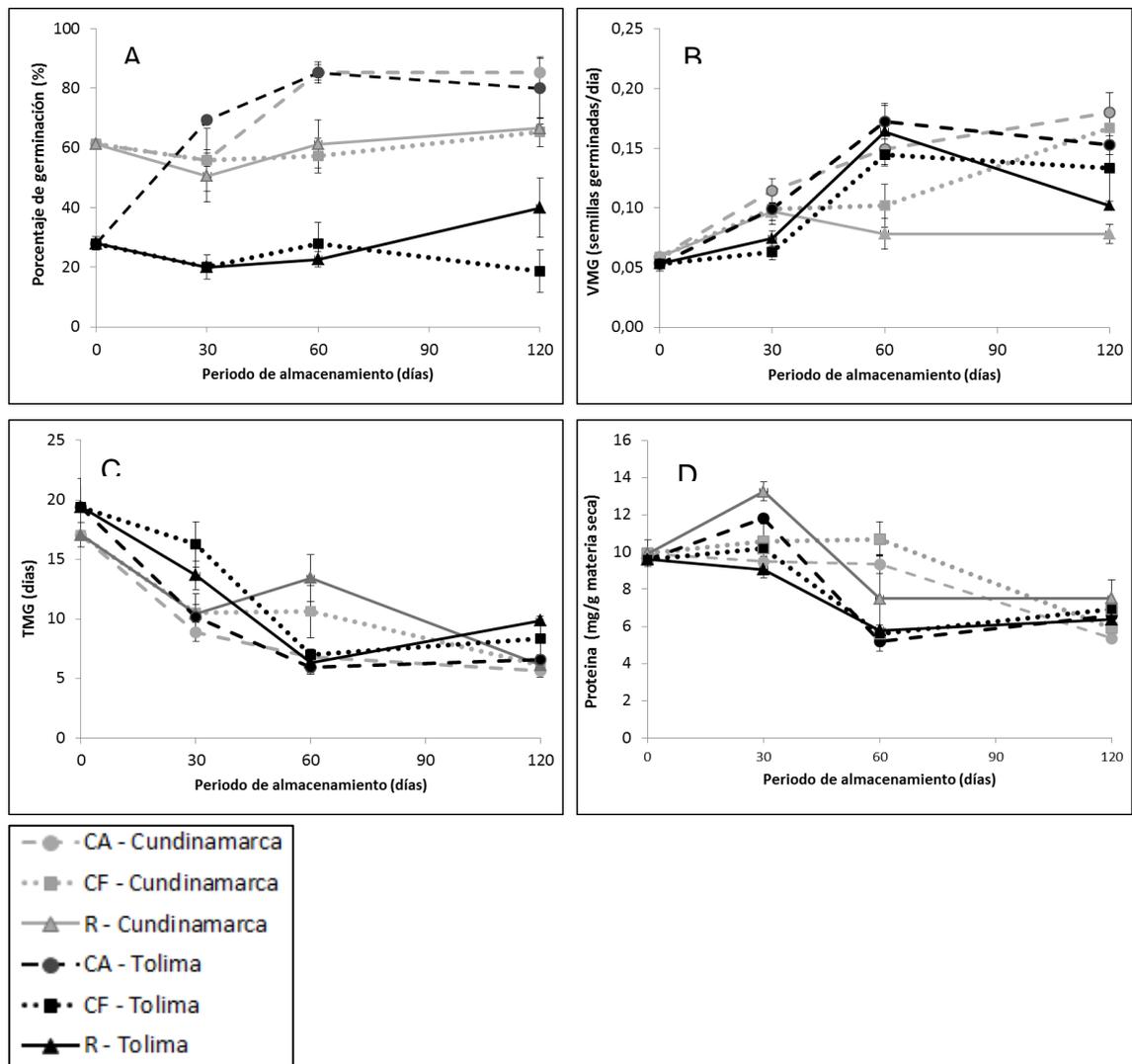


Figura 4-2. Porcentaje de germinación (A), velocidad media de germinación (B), tiempo medio de germinación (C) y contenido de proteína soluble (D) de semillas de *A. squamosa* L. provenientes de Castilla, Tolima (líneas negras) y Apulo, Cundinamarca (líneas grises) durante cuatro períodos de almacenamiento en condición ambiental CA (líneas intermitentes), cuarto frío CF (puntos continuos) y refrigerador R (líneas continuas). Incubación para germinación a 35°C y HR de 60% en turba húmeda. Barras verticales indican error estándar (\pm), n=4.

Cambios en el contenido de azúcares durante el almacenamiento de las semillas

En semillas sin almacenar se observó un mayor contenido de sacarosa (7,82 mg/g) que de glucosa y fructosa, los cuales presentan niveles similares (4,11 y 4,37 mg/g, respectivamente). Con el almacenamiento en CF por 120 días no hubo variación significativa en los niveles de sacarosa, aunque el contenido de glucosa y fructosa presentaron una leve disminución (3,13 y 2,69 mg/g). Cuando las semillas se almacenaron en R se observaron cambios significativos en la concentración de los azúcares evaluados; un incremento del 22% en los niveles de sacarosa (9,62 mg/g) con respecto a las semillas sin almacenar, y un decrecimiento en los contenidos de los azúcares reductores glucosa (1,24 mg/g) y fructosa (0,94 mg/g). Las semillas almacenadas en condición ambiente (CA) presentan un incremento del 72,3% en el contenido de sacarosa (13,49 mg/g) en comparación con el contenido de este azúcar en semillas sin almacenar. La concentración de glucosa en este período de tiempo, en CA (1,24 mg/g) se disminuyó en 70% mientras que a diferencia de las demás condiciones de almacenamiento, los niveles de fructosa (7 mg/g) presentaron un incremento del 61% con respecto a las semillas sin almacenar (Figura 4-3).

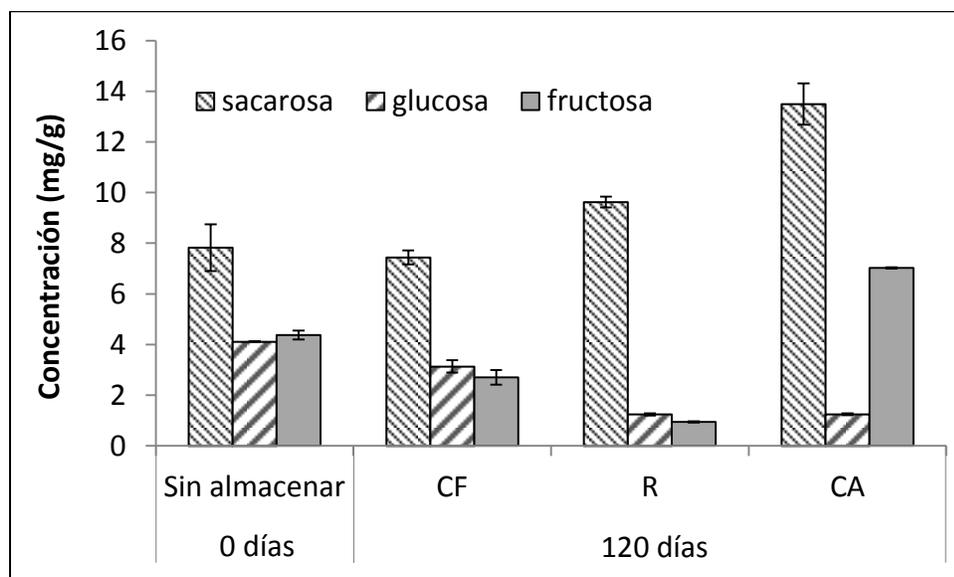


Figura 4-3. Cambios en la concentración (ug/mg materia fresca) de sacarosa, glucosa y

fructosa en semillas de *A. squamosa* L. sin almacenar (0 días) y almacenadas durante 120 días en condición ambiental CA, cuarto frío CF y refrigerador R.

4.3 Discusión

Las semillas de anón presentaron fluctuaciones en el contenido de humedad, las cuales son mayores en cuarto frío a 4°C y en refrigerador a 10°C, debido a las altas HR presentes en estos ambientes, los cuales provocan constantes ajustes de la humedad de semillas almacenadas en empaques permeables al vapor de agua (Carvalho y Nakagawa, 2000), tal es el caso de las bolsas de papel empleadas para el almacenamiento en este estudio. En las semillas provenientes de Castilla, Tolima, almacenadas a temperatura ambiente se presentaron variaciones en el contenido de humedad, disminuyendo a los 30 días de almacenamiento. Estas variaciones se presentaron debido posiblemente a que el equilibrio higroscópico de la semillas varía de acuerdo con la humedad relativa del ambiente lo cual se evidencia por Teófilo *et al.* (2004), quienes observaron en *Myracrodruom arundeuva* variaciones en la humedad a lo largo del tiempo de almacenamiento, cuando las semillas se almacenaron al ambiente en bolsas de papel.

Los porcentajes de humedad más bajos no se relacionan con la disminución de la calidad fisiológica de las semillas, hecho que se observa en los resultados de germinación (Figura 1), en donde son el tiempo y la temperatura los factores que más influyen. Esto podría indicar que las semillas de anón son tolerantes a la desecación, pudiendo presentar un comportamiento ortodoxo. Al respecto Pinto *et al.* (2005) indicaron que las semillas de anón toleran la desecación hasta un contenido de humedad del 1,5% y no pierden la viabilidad durante 6 meses de almacenamiento a -20°C. Dornelles *et al.* (2002) indicaron que la reducción de la humedad en semillas anón promueve un aumento en el vigor, indicando que estas toleran desecación y por lo tanto se comportan como ortodoxas. Sin embargo, para clasificar el comportamiento de una semilla como ortodoxa, ésta debe soportar desecación hasta 5% de humedad (Hong y Ellis, 1996). Al respecto Pulecio (2012), indica que la condición ortodoxa es la más probable en las semillas de anón, ya que estas lograron una viabilidad cercana al 77,52% en un rango de humedad entre 5 y 10% y valores promedio de germinación a los 30 días del 42,1%. Otras semillas de anonáceas como chirimoya y guanábana son consideradas ortodoxas por Dorneles *et al.* (2002) debido a que soportan desecación en la cual se puede bajar el contenido de humedad y almacenarlas a bajas temperaturas por periodos considerables (Engelmann y Engels, 2002).

El almacenamiento de semillas de *Annona squamosa* L. a temperatura y humedad ambientales (CA) y durante 60 y 120 días generó las mejores respuestas en las variables de germinación evaluadas para las semillas de las dos localidades; esto es mayores PG, VMG y menores TMG lo que indica que bajo estas condiciones se presenta una conservación adecuada de la calidad fisiológica de las semillas.

En *A. squamosa* L. otros autores ha reportado el mismo comportamiento de las semillas en condiciones de almacenamiento. Magalhães *et al* 2009, encontraron porcentajes de germinación del 88% cuando semillas de anón fueron almacenadas a temperatura ambiente (máxima: 25,3°C, mínima: 16,1°C.), en papel, durante 6 meses. Dornelles *et al.* (2002) verificaron un aumento gradual en la VMG y PG hasta en tres meses de almacenamiento. Sin embargo Souza (2005) no encontró influencia del almacenamiento por 0, 30 y 60 días sobre la germinación de las semillas de anón, cuando no recibieron tratamientos para romper latencia.

En otras especies como *Moringa oleífera* se observa un mantenimiento de la calidad fisiológica de las semillas cuando son almacenadas en papel en condiciones ambientales por 6 meses (Teófilo *et al.* 2004) lo cual es similar a lo hallado en este estudio.

Este comportamiento puede estar asociado con la presencia de latencia en las semillas de *A. squamosa* L. Se ha señalado que las semillas de Annonaceae al ser dispersadas presentan un embrión pequeño, considerado poco desarrollado e inmaduro Noorman *et al.* (1992). En el caso de *Annona squamosa* L. es característica la presencia de un embrión rudimentario, poco desarrollado pero diferenciado (Ver capítulo I) con una tasa lenta tasa de crecimiento, lo que hace que la semilla tarde de 1 a 3 meses en germinar (Hayat, 1963). Esto indica la presencia de latencia la cual ha sido reportada tanto como morfológica (Baskin y Baskin, 2004) como morfofisiológica compleja no profunda (ver capítulo 3) en donde adicional al embrión rudimentario, un mecanismo fisiológico inhibe la germinación de la semilla (Baskin y Baskin, 2001, Baskin y Baskin, 2004). Con base en los resultados es posible sugerir que el período y las condiciones (temperatura y HR) de almacenamiento influyen directamente en la superación de forma natural de la latencia presente en las semillas de *A. squamosa* L y por consiguiente en la calidad fisiológica de las semillas.

En concordancia con lo expuesto Dornelles *et al.* (2002) indican que las semillas de anón poseen latencia inducida por la inmadurez embrionaria y que esta puede ser superada con el almacenamiento. En chirimoya y guanábana Lobo *et al.* (2007) observaron que la latencia morfofisiológica también puede ser fácilmente superada con el almacenamiento. En *A. crassiflora* autores como Rizzini (1973) y Silva *et al.* (2007) observaron que las semillas poseían embriones poco desarrollados en el momento de la madurez de los frutos y es requerido un período posterior a la dispersión para que finalice su desarrollo. Así mismo, para Pinto y Genu (1984) en guanábana la latencia endógena es superada completamente con el almacenamiento

El efecto del tiempo y condiciones de almacenamiento sobre la germinabilidad y conservación de la calidad fisiológica de las semillas esta asociado al metabolismo de azúcares y proteína. La concentración de proteína disminuyó con el tiempo de almacenamiento, presentando para el caso de semillas obtenidas de Apulo, valores más bajos a los 120 días y para las semillas provenientes de castilla, entre los 60 y 120 días. Esta reducción en el contenido de proteína puede deberse a varios factores dentro de los que están, el incremento en la tasa de pérdida de proteína en cotiledones y ejes embrionarios, el daño en el sistema sintetizador de proteína y la síntesis o activación de grandes cantidades de enzimas proteolíticas durante el deterioro de las semillas (Bewley y Black 1994). Se ha demostrado que las semillas de *Vigna radiata*, *Cicer arietinum* bajo envejecimiento, natural o artificial incrementaron su actividad proteasa en semillas (Agarwal y Kharlukhi, 1987), así mismo, en *Shorea robusta* incrementos en esta actividad fueron registrados en ejes embrionarios y cotiledones (Krishna *et al.*, 2000). La pérdida masiva de proteína celular también fue observada en semillas de arroz (Prabhakar y Mukherjee 1980), *Shorea robusta* (Nautiyal y Purohit 1985), *Pisum sativum*, *Phaseolus aureus* y *Citrus reticulata* (Samsbery y Banerjee 1979) durante almacenamiento.

Se observó un gran efecto de las condiciones de almacenamiento durante 120 días sobre los contenidos de azúcares en las semillas de *Annona squamosa* L. A temperatura y humedad relativa ambiente (CA), los niveles de sacarosa fueron mucho mayores a los observados para semillas sin almacenamiento y para semillas almacenadas en cuarto frío (CF) y refrigerador (R). Esto es posible debido a que las actividades de las enzimas que controlan los niveles de sacarosa como la sacarosa fosfato sintetasa (enzima que sintetiza sacarosa a partir de fructosa y glucosa) y la invertasa (enzima que degrada la sacarosa produciendo fructosa y glucosa) se ven disminuidas a bajas temperaturas (Iyare y Ekwukana, 1992) lo que explicaría las diferencias encontradas en los niveles de sacarosa. En CF a 4°C grados no hubo variaciones importantes en los niveles de azúcares reductores, sin embargo, en refrigerador a 10°C y en almacenamiento a condición ambiental, hubo una reducción en los niveles de glucosa acompañados de un incremento en el nivel de sacarosa, el cual como se indicó fue mucho mayor en las semillas almacenadas a temperatura ambiente. Esto se debe a que los azúcares reductores son usados como sustrato para la formación de sacarosa (Hubbard *et al.*, 1991) para el metabolismo de respiración y para otros procesos que consumen energía (Fuchs *et al.*, 1980), sin embargo, cuando las semillas son almacenados a bajas temperaturas los niveles de azúcares reductores se mantienen fijos (Medlicott *et al.*, 1986) tal como se observó en las semillas almacenadas en cuarto frío (CF). En este ensayo, los niveles de glucosa y fructosa disminuyeron con el almacenamiento en refrigerador (R), pero no se observó un incremento considerable en los niveles de sacarosa, en comparación con las semillas sin almacenar. En contraste con el almacenamiento en CA los niveles de glucosa disminuyeron y hubo un gran incremento en sacarosa lo que sugiere que en esta condición tanto el metabolismo de respiración como la acción de la sacarosa fosfato sintetasa funcionaron normalmente. Estas

variaciones en el contenido de azúcares como sacarosa también pueden estar relacionadas con incrementos en la solubilización de reservas como se ha reportado en la madurez fisiológica para otras semillas con comportamiento ortodoxo (Nkang, 2002).

La influencia de la temperatura de almacenamiento sobre el metabolismo de azúcares en semillas también ha sido registrada para semillas de otras especies. En semillas de *Caesalpinia echinata* García (2006), encontró que los valores de glucosa y fructosa fueron constantes en semillas almacenadas en bolsas de papel por 18 meses en cámara fría (6 ± 1 °C y HR= $85\% \pm 5\%$), disminuyendo considerablemente a temperatura ambiente (25 ± 10 °C y HR= $80\% \pm 15\%$). En la condición de bajas temperaturas los contenidos de sacarosa permanecieron estables, lo cual también fue registrado para las semillas de maíz (Bernal-Lugo y Leopold, 1992).

Con los resultados es posible relacionar la germinabilidad de las semillas de *Annona squamosa* L con el metabolismo de carbohidratos en las condiciones de almacenamiento evaluadas. Las mejores respuestas de las variables de germinación PG, VMG y TMG para ambas localidades se presentaron en condición ambiente a 60 y 120 días, condición en la cual se incrementan los niveles de sacarosa y fructosa (a los 120 días). En contraste, los PG y VMG más bajos y mayores TMG se presentaron en semillas sin almacenar (0 días) y almacenadas a en CF y en R, en donde hay menores contenidos de sacarosa debido a las posibles limitaciones para su metabolismo por parte de las enzimas responsables. Las diferencias encontradas en azúcares solubles y capacidad de germinación de las semillas de *A. squamosa* L. sugieren que la longevidad de las semillas puede estar relacionada con su tasa de respiración, la cual, puede ser diferente según las condiciones de almacenamiento tal y como lo indica García (2006) para semillas de *Caesalpinia echinata* LAM. Los datos indican que con el almacenamiento en cuarto frío (4°C) y en refrigerador (10°C) la disminución de la calidad de la semilla durante almacenamiento expresada primero como un decrecimiento en la tasa de germinación y subsecuentemente en la pérdida de germinabilidad, puede deberse a cambios en los contenidos de carbohidratos solubles. A temperaturas bajas, los niveles de sacarosa disminuyeron o permanecieron estables con respecto a semillas sin almacenar, lo que resulta en una limitada disponibilidad de sustratos respiratorios para la germinación. Otra posibilidad es que con la disminución de disacáridos se limita el efecto protector de azúcares sobre la integridad estructural de la membrana y la habilidad de las semillas para mantener el estado vitrificado y dar paso a un estado no cristalino líquido de alta viscosidad (Bernal-Lugo y Leopold, 1992).

Esto indica que se requieren niveles adecuados de sacarosa para el mantenimiento de la viabilidad de las semillas y garantizar germinabilidad durante el almacenamiento de *A. squamosa* L. La sacarosa y otras formas de azúcares no reductores contribuyen a la estabilidad estructural de organelos, membranas y enzimas y otras macromoléculas (Obendorf, 1997; Peterbauer y Richter, 2001). En particular la sacarosa es excepcionalmente efectiva en la protección de la membrana celular, en sistemas expuestos a desecación es uno de los mejores azúcares vitrificantes (Bernal-Lugo y

Leopold, 1992) pues protege la estructura y función de los fosfolípidos desecados (Caffrey, Fonseca y Leopold, 1988).

5. Conclusiones

Las características anatómicas de la cubierta seminal, el endospermo y el embrión corroboran los datos reportados en la literatura para la familia Annonaceae.

La cubierta seminal es fibrosa y lignificada. Hay presencia de integumento externo e interno. El interno esta conformado por células colapsadas, también es llamado tegmen. El externo compuesto de tres capas distinguibles, exotesta, mesotesta y endotesta. Un rasgo importante hallado fue la presencia de dos capas de la mesotesta, en la cual hay fibras longitudinales ininterrumpidas por áreas de fibras transversales. Así mismo en inmediaciones de la mesotesta se alberga la pericalaza, la cual se registró como una asociación de células parenquimatosas y vasculares.

La endotesta o integumento intermediario, es el tejido de la cubierta seminal que tiene una mayor participación en la formación y constitución de los órganos de la semilla. Junto con el tegmen y debido a sus inclusiones transversales en el endospermo es responsable de la apariencia ruminada de este.

Hay presencia de células de diferentes formas y contenidos en el endospermo, que corresponden a células voluminosas e isoradiométricas, con contenidos lipídicos, células de restos de la nucela e idioblastos.

Los rasgos anatómicos del embrión son similares a lo reportado en diferentes especies de Annonaceae.

La germinación de las semillas maduras de *A. squamosa* L. es un proceso que se presenta en dos etapas separadas y consecutivas: la ruptura de la testa y posteriormente la ruptura del endospermo. En la post-germinación se presenta la formación e inducción de raíces laterales. Estas se producen en la raíz primaria de forma endógena a partir del periciclo.

El debilitamiento del endospermo, se inicia después del cambio en tamaño y forma de este órgano en la ruptura de la testa (primera etapa de germinación) y en el comienzo de la segunda etapa de germinación, en donde se observa cómo el endospermo protruido, a causa del crecimiento de la radícula, despiden restos del plug micropilar.

Durante la germinación hay un gran requerimiento de azúcares solubles por parte del embrión que pueden ser sustrato respiratorio para la división y elongación celular. El endospermo mantiene niveles estables de azúcares solubles, debido a la continua conversión de lípidos y proteínas. En el crecimiento post germinativo no se presenta mayor variación en los niveles de azúcares solubles totales en el embrión ni en el endospermo.

Los niveles de azúcares solubles y de sacarosa están en mayor concentración en el embrión que en el endospermo, por el contrario los niveles de fructosa siempre fueron mayores en el endospermo que en el embrión.

En comparación con glucosa y fructosa, la sacarosa fue el azúcar más acumulado en la semillas sin germinar y el más utilizado en el proceso de germinación de semillas de *A. squamosa* L. Su concentración es más de 10 veces mayor que la glucosa y fructosa.

El marcado uso de azúcares solubles, sacarosa y proteína indican que las semillas de *A. squamosa* L tienen una alta demanda energética durante la germinación.

Durante el proceso de germinación se observa que:

- *En semillas sin germinar* fue posible detectar actividad enzimática peroxidasa y proteína soluble. La sacarosa fue el único azúcar detectado y se encontró en mayor concentración en el embrión que en el endospermo.
- *Después de la imbibición* se disminuyen los contenidos de proteína y hay un gran incremento de la actividad enzimática peroxidasa. En este punto la concentración de sacarosa se disminuye en el embrión y se incrementan los niveles de fructosa. En el endospermo también decrece la concentración de sacarosa y se incrementan los niveles de glucosa y fructosa. Esto indica que después de la imbibición hay una alta actividad metabólica debido a la activación de la respiración. Se presenta una gran demanda de sacarosa y otras fuentes de energía por parte del embrión la cual es soportada por procesos de degradación proteica y por la movilización e hidrólisis de polisacáridos en el endospermo.
- *En la primera etapa de germinación* se presenta la ruptura de la testa. En esta etapa los niveles de proteína soluble continúan disminuyendo y la actividad enzimática peroxidasa sufre una drástica baja en su actividad. La concentración de sacarosa continúa su decrecimiento en el embrión y se incrementan los niveles de glucosa, mientras que los de fructosa no cambian su concentración. En el endospermo la concentración de sacarosa continúa disminuyendo, los niveles de glucosa igualmente, mas los de fructosa permanecen estables. La degradación proteica sigue siendo llevada a cabo para el suministro de aminoácidos libres. Los cambios en los contenidos de azúcares tanto en embrión como en el endospermo indican proceso de síntesis, degradación y removilización de polisacáridos durante la germinación, en la cual puede haber movilización de glucosa y sacarosa, siendo este último el sustrato más utilizado para el proceso de germinación.

- *En la segunda etapa de germinación se presenta la ruptura del endospermo y la protrusión de la radícula. En esta etapa el contenido de proteína presenta un gran incremento, y la actividad enzimática peroxidasa tiene los valores más bajos. Se presentan leves incrementos de la concentración de sacarosa en el embrión y un gran incremento en los niveles de glucosa y fructosa. En el endospermo, los niveles de sacarosa también sufren un leve incremento y se presenta un gran incremento en los niveles de fructosa, mientras que los contenidos de glucosa permanecen estables. En la segunda etapa de germinación de *A. squamosa* L. se da la síntesis y reparación de proteínas. La glucosa y sacarosa son requeridas en esta etapa para estimular la elongación del embrión y así la protrusión radicular.*

Las testas de *A. squamosa* L. no presentan un impedimento a la absorción de agua, funcionando como un tejido de regulación de la hidratación de la semilla.

Las semillas de ambas localidades son dependientes de la temperatura para su germinación. Los mejores valores obtenidos para todas las variables evaluadas (PG, TMG, VMG y E) fueron obtenidos a una temperatura constante de 35°C pudiéndose considerar esta, como la temperatura óptima de germinación

Ninguno de los métodos de eliminación parcial de la testa (lija distal y cortes apical distal, apical proximal y ventral) mejoraron la germinación en semillas de *A. squamosa* L.

Hay un efecto importante de la aplicación de GA₃ exógeno, siendo este tratamiento muy efectivo para el rompimiento de latencia de las semillas de *A. squamosa* L. El tratamiento de GA₃ sobre las semillas incrementó los PG en cada punto del tiempo de incubación, como efecto de grandes incrementos en las tasas de germinación iniciales y menores tiempos en alcanzar la máxima carga de PG.

Las respuestas positivas a la aplicación de ácido giberélico y a la eliminación de testas son una evidencia valiosa que permite demostrar el componente fisiológico de la latencia morfofisiológica.

Las semillas de *A. squamosa* L. presentan características de una latencia morfofisiológica compleja no profunda.

El almacenamiento de semillas de *Annona squamosa* L. a temperatura y humedad ambiental (CA) y durante 60 y 120 días genera las mejores respuestas en las variables de germinación evaluadas para las semillas de las dos localidades. Bajo estas condiciones se presenta una alta conservación de la calidad fisiológica de las semillas.

El periodo y las condiciones (temperatura y HR) de almacenamiento influyen directamente en la superación de forma natural de la latencia presente en las semillas de *A. squamosa* L y por consiguiente en la calidad fisiológica de la semillas.

Las mejores respuestas de las variables de germinación PG, VMG y TMG para ambas localidades se presentan en condición ambiente a 60 y 120 días, condición en la cual se incrementan los niveles de sacarosa y fructosa (a los 120 días). En contraste, los PG y VMG mas bajos y mayores TMG se presentan en semillas sin almacenar (0 días) y almacenadas a en CF y en R, en donde hay menores contenidos de sacarosa debido a las posibles limitaciones para su metabolismo por parte de las enzimas responsables.

La longevidad de las semillas puede estar relacionada con sus tasas de respiración la cual puede ser diferente en las diferentes condiciones de almacenamiento.

Se requieren niveles adecuados de sacarosa para el mantenimiento de la viabilidad de las semillas y garantizar germinabilidad durante el almacenamiento de *A. squamosa* L.

Bibliografía

- AOSA. Association Of Official Seed Analysts. 2000. Rules for testing seeds. Bozeman, Mont. 126p.
- Aguiar, I.B. y M.B. Figliolia. 1993. Sementes florestais e tropicais Abrates, Brasília. 350 p.
- Agarwal, P. y L. Kharlukhi. 1987. Enzyme activities in seeds during storage. *Ind. J. Exp. Biol.* 25: 719– 722.
- Agustí, M. y V. Almela. Aplicación de fitorreguladores en citricultura. Barcelona: Aedos, 1991. 269 p.
- Alonso, J.R. 2011. Manual de histología vegetal. Mundiprensa. España. 345p.
- Amaya, I., M.A. Botella, M. de la Calle, M.I. Medina, A. Heredia, R.A. Bressan, P.M. Hasegawa, M.A. Quesada y V. Valpuesta. 1999. Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Letters* 457, 80–84. 1353, 1990.
- Armitage, A.M., 1994. Ornamental Bedding Plants. CAB International, Wallingford. 157p.
- Arteca, R. N. 1995. Plant growth substances: principles and applications, New York: Chapman & Hall, 332p.
- Araujo, J. 1991. Tratamentos para acelerar e uniformizar a germinação de sementes de pinha (*Annona squamosa* L.). Dissertação de Mestrado. Cruz das Almas. Universidade Federal da Bahia. 82 p.
- Araújo, J. F. 2003. A cultura da pinha. EBDA Salvador, Brasil, 79pp
- Asghar, R. y D. Demason. 1990. Developmental changes in the cotyledons of *Lupinus luteus* L. during and after germination. *American Journal of Botany*, 77: 1342-1353.
- Ba, O., Sagna, M. y M. Ourèye. 2012. Germination Capacity of Annonaceae Seeds (*Annona muricata* L., *A. squamosa* L. and *A. senegalensis* Pers.) Cultivated Under Axenic Conditions. *International Journal of Science and Advanced Technology*. Volume2 No 6.
- Balasaraswathi R. y S. Sadasivam. 1997. Changes in oil, sugar and nitrogenous components during germination of sunflower seeds, *Helianthus annuus*. *Plant Foods Hum Nutr* 51:71-77.
- Barroso, G., M. Morim, A. Peixoto y C. Ichaso. 1999. Frutos e sementes. Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa: Editora UFV, 443 p.
- Barroco R., K. Van Poucke, J. Bergervoet, L. De Veylder, D. Inze D y G. Engler. 2005. The role of the cell cycle machinery in resumption of postembryonic development. *Plant Physiology* 137, 127–140.

- Baskin, C.C. y J.M. Baskin. 2001. Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press, San Diego, California. 666 p.
- Baskin, J.M. y C.C. Baskin. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* 14, 1-16.
- Baskin, C.C., Zackrisson, O y J.M. Baskin. 2002. Role of warm stratification in promoting germination of seeds of *Empetrum hermaphroditum* (Empetraceae), a circumboreal species with a stony endocarp. *American Journal of Botany.* 89(3): 486–493.
- Bayer, C. y O. Appel. 1996. Ocurrence and taxonomic significance of ruminant endosperm. *Bot. Rev.* 62, 301-310.
- Beevers, H. 1961. Incorporation of acetate carbón into sucrose in castor bean tissue. *Biochem. J.* 66: 23p.
- Bellani, L.M., M. Guarnier y A. Scialabba. 2002. Differences in the activity and distribution of peroxidases from three different portions of germinating *Brassica oleracea* seeds. *Physiol. Plant.* 114, 102-108.
- Bemfeld, P. 1962. Comparative Biochemistry. Vol. 3, Florkin M, Mason W (eds.). Academic Press, NY, p. 355-360.
- Bestwick C., I. Brown y J. Mansfield. 1998. Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a non-host hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol* 118: 1067–1078.
- Bewley, J.D. y A. Marcus. 1990. Gene expression in seed development and germination. *Prog. Nucleic Acid Res. MOI. Biol.* 38, 165-193.
- Bewley, J.D. 1997b. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055–1066
- Bewley, J. D. y M. Black. 1982. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Vol. II. Viability, dormancy and environmental control. Berlin: Springer-Verlag., 375p.
- Bewley, J.D., y M. Black. 1994. Seeds: Physiology of development and Germination. New York: Plenum Press
- Bewley J.D. y M. Black M. 1994. *Seeds – physiology of development and germination, 2nd edn.* New York, NY, USA: Plenum Press.
- Bhattacharwa, S. y S. Sen-Mandi, 1985. Studies into causes of non-germination of wheat seeds. *A n. of S ot.*, 56: 475-479.
- Bhowmik, P., T. Matsui y Z. Ahmed. 2001. Changes in the activity of sucrose metabolizing enzymes during germination of wheat seeds. *Pak. J. Biol. Sci.* 4: 1264-1266.
- Blacklow, W.M. 1972. Mathematical description of the influence of temperature and seed quality on the imbibition by seeds of corn (*Zea mays* L.). *Crop Science, Madison*, v. 12, p. 643 – 646,
- Blackman S., R. Obendorf y A. Leopold. 1992. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. *Plant Physiology* 100: 225-230.
- Blokhina, O., E. Virolainen y K. V. Fagerstedt. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Botany* 91, 179-194.

- Boesewinkel, F.D. y F. Bouman. 1984 The seed structure. en: Johri, B.M. Embryology of angiosperms. Berlin: Springer-Verlag. p.567-610.
- Bouin, P. 1897. Phenomenes Cytologique anoramoux dans.1 Histogenes. Nancy.
- Bouaziz, A. y L. Bruckler. 1989. Modeling of wheat imbibition and germination as influenced by soil physical properties. Soil Science Society America Journal, v.53, p.219-227.
- Borges, E. y A. Rena. 1993. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I.B., PINÃ-RODRIGUES, F.C.M. & FIGLIOGLIA, M.B. (ed). *Sementes florestais tropicais*. Brasília: Abrates, p.83-135.
- Bradford, M.N. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Bradford, K.J., F. Chen, M. Cooley, P. Dahal, B. Downie, K. Fukunaga, O. Gee, S. Gurusinghe, R. Mella, H. Nonogaki Wut. y Yim, K. 2000. Gene expression prior to radicle emergence in imbibed tomato seeds. In: Black, M., Bradford, K. J., Vazquezramos, J. *Seed Biology: advances and applications*. Wallingford: CAB International, p.231 – 251.
- Braga. J.F. 2003. Germinação de sementes de mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam. – Sterculiaceae). En: dormência, temperatura, fotoblástismo e potencial osmótico. 2003. 61p. Tesis de maestría. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu,
- Bruckler, L. 1983. Rôle des propriétés physiques du lit de semnces sur l'imbibition et la germization: I. Elaboration d'un modèle du système "terre-graine". *Agronomie*, v.3, p.213-222.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Buckeridge, M., H. Dos Santos y M. Tíne, 2000a. Cell wall storage polysaccharides in seeds. Structure, metolism, function and ecological aspects. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 141-156.
- Buitink, J., M. Hemminga y F. Hoekstra. 2000. Is there a role for oligosaccharides in seed longevity? An assessment of intracellular glass stability. *Plant Physiol.* 122, 1217-1224.
- Caffrey M., V. Fonseca y A. Leopold. 1988. Lipid-sugar interactions. *Plant Physiol* 86: 754-758.
- Callis, J. 1995. Regulation of protein degradation. *Plant Cell.*, 7, 845-857.
- Canvin, D. T. y H. Beevers. 1961. Sucrose synthesis from acetate in the germinating castor bean. In: *Kinetics & Pathway*. J. Biol. Chem. 236:988-995.
- Carvalho, N. y J. Nakagawa. 2000. Sementes. Ciencia, tecnología e producao. FUNEP. 588p.
- Cardona, C.E., H. Aramendiz, J. Robles, V. López y J. Ubarnes. 2005. Efecto de diferentes ambientes y empaques sobre la viabilidad de semillas de

- maracuya (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). Temas Agrarios. 10(2), 15-25.
- Carvalho, N. y J. Nakagawa. 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção, 4 edição: Funep, Jaboticabal. 588p.
- Castro, M. 2003. Influência de diferentes temperaturas na germinação de sementes de *Tabebuia capitata* (Bur. et K. Schum. Sandw) Tesis en Biología. Manaus, Brasil. Instituto de Tecnologia de la Amazonía. Universidad de Manaus. 24 p
- Catunda, P., H. Vieira, R. da Silva y S. Posse. 2003. Influência do teor de água, da embalagem e das condições de armazenamento na qualidade de sementes de maracujá amarelo. Rev. Bras. Sementes 25(1), 65-71.
- Cavalcante, A. y S. Perez. 1995. Efeitos da temperatura sobre a germinação de sementes de *Leucaena leucocephala* (LAM) de WIT. *Revista Brasileira de Sementes* 17(1): 1-8.
- Cervantes, E., A. Rodriguez y G. Nicolás. 1994. Ethylene regulates the expression of a cysteine proteinase gene during germination of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Mol. Biol.*, 25, 207-215.
- Centre for Underutilised Crops. 2002. Fruits for the Future Annona. Institute of Irrigation and Development Studies, University of Southampton, Department of International Development (DFID), Southampton, United Kingdom.
- Chen, Y., F. Ji, H. Xie, J. Liang y J. Zhang. 2006. The regulator of Gprotein signaling proteins involved in sugar and abscisic acid signaling in Arabidopsis seed germination. *Plant Physiol.* 140:302–310.
- Chen. F., R. Martin, S. Song y H, Nonogaki. 2011. Seed Development and Germination. *Plant Tissue Culture, Development, and Biotecnología*. 9: 127-140
- Chen, F. y K. Bradford. 2000. Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. *Plant Physiology* 124, 1265–1274.
- Chien. C., L. Kuo-Huang y T. Lin. 1998. Changes In Ultrastructure And Abscisic Acid Level, And Response To Applied Gibberellins In *Taxus Mairei* Seeds Treated With Warm And Cold Stratification. *Annals of Botany*. 81: 41-47
- Chen, Y. y J. Burris. 1990. Role of carbohydrates in desiccation tolerance and membrane behaviour in maturing maize seed. *Crop Science* 30: 971-975.
- Corner, E. J. H., 1949. The annonaceous seed and its four integuments. - *New Phytol.* 48:332-364.
- Corner, E. J. H. 1976. The seeds of dicotyledons, 1 & 2. - Cambridge: Cambridge University Press.
- Copeland, L. 1990. Enzymes of sucrose metabolism. In: *Methods in Plant Biochemistry*. Vol III. Enzymes of primary metabolism. Academic Press, London, pp: 73-86.
- Come D., R. Durand, B. Durand, R. Jacques, P. Penon, y J. Roland. 1982. Croissance et développement, *Physiologie végétale* II. 465 p.

- Come, D. 1968. Problèmes de terminologie posés par la germination et ses obstacles. *Bull. Soc. Fran. Physiol. Vég.*, 14(1): 3-9.
- Come, D. 1982. Germination, pp. 129-225 In: *Croissance et développement, Physiologie végétale II*, P. Mazliak (ed.), Hermann, Paris, 465 p.
- Colauto, N.M., I. Massanori y C.S. Vieira. 2003. Superação da dormência em sementes de atemóia e frutado- conde. *Revista Brasileira de Fruticultura* 25(2), 305-308.
- Coll, J.B., G. Rodrigo, B. García y R. Tames. 2001. *Fisiología vegetal*. Madrid: Ediciones Pirámide. 566p
- Crowe, J.H. y L. Crowe. 1992. Membrane integrity in anhydrobiotic organisms: Toward a mechanism for stabilizing dry seeds. In *Water and Life*, G.N. Somero, C.B. Osmond, and C.L. Bolis, eds (Berlin : Springer-Verlag), pp. 87-103.
- Cruz, E. 2002. Cultivo de Anona. Boletín Técnico No. 7. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal, CENTA, El Salvador. 20 p
- Crowe, J.H., J.F. Carpenter y L.M. Crowe. 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 73-103.
- da Silva, E., P. Toorop, A. van Aelst y H. Hilhorst. 2004. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. *Planta* 220: 251–26
- da Silva E., D. De Melo, A.C. Davide, N. De Bode, G.B. Abreu, J.M.R. Faria y H.W.M. Hilhorst. 2007. Germination ecophysiology of *Annona crassifloraseeds*. *Ann. Bot.* 99, 823-830.
- Dalisay RF, J. Kúć. 1995. Persistence of reduced penetration by *Colletotrichum legenarium* into cucumber leaves with induces systemic resistance and its relation to enhanced peroxidase and chitinase activities. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47, 336-341.
- Davies, H.V. y Chapman, J.M. The control of food mobilization in seeds of *Cucumis sativus* L. 4. The pattern of protein degradation. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 101: 347-353, 1981.
- Davletova, S., L. Rizhsky, H. Liang, Z. Shengqiang, D. Oliver, J. Coutu , V. Shulaev, K. Schlauch y R. Mittler R. 2005. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *The Plant Cell* 17, 268–281.
- De Gara, L., M. de Pinto y O. Arrigoni. 1997. Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiologia Plantarum* 100, 894–900.
- De Melo, D., A. Davide, E. da Silva, J. Faria y S. Queiroz. 2007. Estudo morfo-anatomico do endosperma e embrião de sementes de *Annona crassiflora* Mart. *Revista Cerne*, in press.
- De Smet, S., P. Van Damme, X. Scheldeman y J. Romero. 1999. Seed structure and germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). En: *Proceeding of the first International Symposium on Cherimoya*, Loja, Ecuador. Van

- Damme P., X. Scheldeman (eds.). ISHS, Loja, Ecuador. *Acta Horticulturae*, 497 : 267-278.
- Dekkers, B., J. Schuurmans y S. Smeekens. 2004. Glucose delays seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218:579–588.
- Delouche, J.C. 2002. Germinación, deterioro y vigor de semillas. *Seeds News* 6(6). En: http://www.seednews.inf.br/espanhol/seed66/artigocapa66a_esp.shtml; consulta: oct 2012.
- Delouche, J.C. y C. Baskin. 1973. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Sci. Technol.* 1(2), 427-452.
- Delouche, J.C., R.K. Matthes, G.M. Dougherty y A.H. Boyd. 1973. Storage of seed in subtropical and tropical region. *Seed Science and Technology* 1(2): 671-700.
- Devi, S. R. y M. N. V. Prasad. 2005. Antioxidant capacity of *Brassica juncea* plants exposed to elevated levels of copper. *Russ. J. Plant Physiol.* 52, 205–208.
- Dias, P., K. Wilson, y A. Tan-Wilson. 1993. Immunocytochemical analysis of proteolysis in germinating soybean. *Phytochemistry*, 33: 961-968.
- Dornelles, A., A. Lima y V. Campos. 2002. Avaliação do potencial de armazenamento de sementes de *Annona crassiflora* Mart, *Annona muricata* L.e *Annona squamosa* L. Anais do 17º Congresso Brasileiro de Fruticultura, Belém, Brasil, CD-Rom.
- Dučić, T., I. Lirić-Rajlić, A. Mitrović y K. Radotić. 2003. Activities of antioxidant systems during germination of *Chenopodium rubrum* seeds. *Biol. Plant.* 47, 527-533.
- Dubois, M. K. Gilles, J. Hamilton, P. Rebers y F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356
- Ellis, R.H., T. Hong y E. Robrechts. 1985a. Handbook for Seed Technology for Genebanks, vol. 1: Principles and Methodology. IBPGR, Rome, Italy.
- El-Keblawy, A. y A. Al-Rawai. 2006. Effects of seed maturation time and dry storage on light and temperature requirements during germination in invasive *Prosopis juliflora*. *Flora* 201, 135–143.
- Dierking, E. y K. D. Bilyeu. 2009. Raffinose and stachyose metabolism are not required for efficient soybean seed germination. *Journal of Plant Physiology* 166. 1329-1335.
- Engelmann, F. y J. Engels. 2002. Technologies and strategies for ex situ conservation. En: Engels, J. M. M.; Rao, V. R.; Brown, A. H. D. & Jackson, M. T. (Eds). *Managing plant genetic diversity*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, p.89-104.
- Esau, K. 1972. Anatomía Vegetal. Ediciones Omega S.A. Barcelona. 775 p.
- Esquinca, A.R.G., J.G.A. Moctezuma y G.M.P. Pérez. 1997. Duración de la latencia e importancia de la cubierta dura y la inmadurez anatómica, en la imbibición de la germinación de papausa blanca (*Annona diversifolia* Saff,

- Magnoliade, Annonaceae*). Investigación, Ciencias y Artes en Chiapas, México. pp. 37-44.
- Fang, S., Y. Wang, Z. Wei y Z. Zhu. 2006. Methods to break seed dormancy in *Ciclocarya paliurus* (Batal) Iljinskaja. *Scientia Horticulturae*. Volume 110, Issue 3. P. 305-309.
- Faye, L. y A. Ghorbel, 1983. Studies on β -fructosidase from radish seedlings. 11. 8 iochemi cal a nd im munocytoc t-e m ical for cell-wallbound forms In *vitro*. *PI.Sci. Lett.*, 29: 33-48.
- Fath, A., P. Bethke, J. Lonsdale, R. Meza-Romero y R. Jones. 2000. Programmed cell death in cereal aleurone. *Plant Mol. Biol.* 44, 255–266.
- Farrant, J. M., N. Pamment y P. Berjak P. 1993. Seed development in relation to desiccation tolerance: a comparison between desiccation sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation tolerant types. *Seed Science Research*, 3 (1): 1-13.
- Fenner, M. y K. Thompson. 2005. *The ecology of seeds*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ferreira G., E. Cereda, C. Silva, R. Cunha y A. Cataneo. 1997. Imbibition studies of Sugar Apple (*Annona squamosa* L.) and Atemoya (*Annona* Hibrid) Seed. In: *Memorias del II Congresso International de Anonaceas*. Universidad Autonoma Chapingo (UAC), Chapingo, Mexico, pp. 210- 225.
- Ferreira, G., C.P. Silva, E. Cereda y J.F. Pedras. 1998. Efeito do ácido giberélico na germinação de sementes de fruta-do-conde. pp. 186-187. En: *Anais Congresso Nacional de Botânica 49*. Sociedade de Botânica do Brasil, Salvador.
- Ferreira, G.Z., L.A. Fogaça y M.M. Malavasi. 1999. Germinación de semillas de *Annona squamosa* L., sometidas a diferentes tiempos y concentraciones de ácido giberélico. En: *Memorias del II Congreso Internacional de Anonáceas*. Universidad de Ciencias y Artes del Estado de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. pp. 79.
- Ferreira, G., P.R. Erig y E. Moro. 2002. Uso de ácido giberélico em sementes de fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.) visando á produção de mudas em diferentes embalagens. *Revista Brasileira de Fruticultura* 24(1), 178-182.
- Ferreira, F.R. y A.C. Pinto. 2005. Chapter: 8: Genetic Resources En: Williams, J.T., R.W. Smith, A. Hughes, N. Haq y C.R. Clements. (eds.). *Annona species*. International Centre for Underutilized Crops, University of Southampton. 284p.
- Finch-Savage, W.E. y G. Leubner-Metzger. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*; 171, 501-523.
- Foley, M.E. 2001. Seed dormancy: An update on terminology, physiological genetics, and quantitative trait loci regulating germinability. *Weed Sci.* 49:305–317.
- Fontaine, O., C. Huault, N. Pavis y J. Billard. 1994. Dormancy breakage of *Hordeum vulgare* seeds: effect of hydrogen peroxide and stratification on

- glutathione level and glutathione reductase activity. *Plant Physiology and Biochemistry* 32, 677–683.
- Fuchs, Y., E. Pesis y G. Lauberman. 1980. Changes in amylase activity, starch and sugar contents in mango fruit pulp. *Scientia Horticulturae* 13: 155-160.
- Galastri, N. 2008. Morfoanatomía e ontogênese de frutos e sementes de *Annona dioica* A. St.- Hil., *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Saff. e *Xylopia emarginata* Mart. (Annonaceae). Tesis de Maestría. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Bio ciencias, Botucatu.
- Garcia, I. S., A. Souza, C. Barbedo, S. Dietrich y R. Figueiredo-Ribeiro. 2004. Changes in soluble carbohydrates during storage of *Caesalpinia echinata* LAM. seeds, an endangered leguminous tree from the brazilian atlantic forest. *Braz. J. Biol.*, 66(2B): 739-745.
- Garner, R.J. y S. Chaudri. 1976. The propagation of tropical fruit trees. East Malling: Commonwealth Bureau of horticulture and Plantation Crops. 566p.
- Garwood, N.C. 1995. Studies in Annonaceae. XX. Morphology and ecology of seedlings, fruits and seeds of selected Panamanian species. *Botanische Jahrbücher für Systematik*, v.117, p.1-152.
- Geneve, R., 2003. Impact of temperature on seed dormancy. *HortScience* 3 (38), 336–341.
- Gentil, D. 2001. Conservação de sementes do cafeeiro: Resultados discordantes ou complementares? *Bragantia*, 60 (3): 149-154.
- George, A.P. y R. Niessen. 1987. Propagation of *Annona* species: a review. *Scientia Hort.* 33, 75-85.
- George, A. y R. Nissen. 1987b. Effects of cincturing, defoliation and summer pruning on vegetative growth and flowering of custard apple (*Annona cherimola* X *Annona squamosa*) in subtropical Queensland. *Aust. J. Exp. Agr.* 27, 915 – 918.
- George. A.P, y R. Nissen. 1993. Annonaceous. En: R. Macrae. R.K. RobÍDson and M.I. Sadla (Editors). *Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutritkm*. Academic Press, London, pp. 198-199
- George. A.P. 1985. Custard apple. en: *Tropical Tree Fruits for AUS*. Itali. Queensland Department of Primary Industries. Hrisbane. pp. 3.s-41.
- Gepts, P. 2002. A comparison between crop domestication, classical plant breeding and genetic engineering. *Crop Sci.* 42, 1780-1790.
- Giami, S., B. Chibor, K. Edebiri y S. Achinewhu. 1999. Changes in nitrogenous and other chemical constituents, protein fractions and *in vitro* protein digestibility of germinating fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis* Hook). *Seed Plant Foods Hum Nutr* 53:333-342.
- Gibson, S. 2000. Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiol* 124:1532–1539
- Gibson, S. 2004. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *J Exp Bot* 55:253–264.

- Giorgini, J. y C. Campos. 1992. Changes in the content of soluble sugars and starch synthesis and degradation during germination and seedling growth of *Coffea arabica* L. R. Bras.Fisiol. Veg. 4(1):11-15
- Giorgini, J. y C. Sudat. 1990. Ribonucleic acid synthesis in embryonic axis of coffee (*Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo). Revista Brasileira de Botânica, 13:1-9.
- Gower, J. C. 1971. A General Coefficient of Similarity and Some of its Properties', *Biometrics* 27, 623-637
- Godoi, S. y M. Takaki. 2004. Effects of light and temperature on seed germination in *Cecropia hololeuca* Miq. (Cecropiaceae). Braz. Arch. Biol. Technol. 47(2):185-19.
- Grant, J., B. Yun, G. Loake. 2000a. Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity. *Plant J* 24: 569–582
- Groot, S., B. Kieliszewska-Rokicka, E. Vermeer, y C. Karsse. 1988. Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle emergence. *Planta* 174.
- Grissom, Y. y R. Pilet. 1984. Cytoplasmic and wall isoperoxidases in growing maize roots. *Journal of Plant Physiology* 18, 189-199
- Guerrero, E. 2005. Estudio sobre el manejo integrado del cultivo del anón (*Annona squamosa* L.) en el municipio de Apulo, Cundinamarca. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 54p.
- Guerrero, E. y G. Fisher. 2007. Manejo integrado en el cultivo de anón (*Annona squamosa* L.).
- Gutierrez, L., Van Wuytswinkel, O., Castelain, M., 2007. Combined networks regulating seed maturation. *Trends Plant Sci.* 7 (12), 294–299.
- Guerrero, E. 2005. Estudio sobre el manejo integrado del cultivo del anón (*Annona squamosa* L.) en el municipio de Apulo, Cundinamarca. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 54p.
- Hadas, A. y D. Russo. 1974. Water uptake by seeds as affected by water stress, capillary conductivity and seed-soil water contact: I. Experimental study. *Agronomy Journal*, v.66, p.643-47.
- Hartmann, H. y D. Kester. 1975. Propagación de plantas. Principios y prácticas. Editorial Continental S.A. México, p.129-153.
- Hartmann, H.T., D.E. Kester y F.T. Davies. 1997. *Plant Propagation: Principles and Practices*. Prentice Hall International, New Jersey
- Harris, N. y M. Chrispeels. 1975. Histochemical and biochemical observations on storage protein metabolism and protein body autolysis in cotyledons of germinating mung beans. *Plant Physiology*, 56: 292-299.

- Harty, R. L. y J. Butler. 1975. Temperature requirements for germination of green panic, *Panicum maximum* var. trichoglume, during the after-ripening period. *Seed Science and Technology*, Zürich, v. 3, n.2, p.529-536,
- Hayat, M.A. 1963. Morphology of seed germination and seedling in *Annona squamosa*. *Botanical Gazette*, v.124, p.360-362.
- Hayat, M.A., J. Canright. 1965. The developmental anatomy of the Annonaceae. I. Embryo and early seedling structure. *Am. J. Bot.* 52, 228-237.
- Hawker, J. y R. Dixon. 1985. Sucrose. In: *Biochemistry of carbohydrates in green plants*. pp. 1-51. Academic Press, London.
- He, L. y J. Burris. 1992. Respiration and Carbohydrate Metabolism during Germination of *sh2* and *Sh2* Sweet Corn Seed. *HORTSCIENCE* 27(12):1306-1308.
- Heijden, E. van der y F. Bouman. 1988. Studies in Annonaceae. X. Seed anatomy of the *Annona* group. *Botanische Jahrbücher für Systematik*, v.110, n.1, p.117-135.
- Hegashi, E., R. Silveira, C. Golveia y L. Basso. 2002. Ação fisiológica de hormônios vegetais nas condições hídricas, metabolismo e nutrição mineral. En: Castro, P.R.C., Sena, J.O.A., Krüge, R.A. *Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal*, Maringa: Eduem, cap.9, p. 139-158.
- Hernandez, D., M. Rios y A. Marroquin. 1999. Efectos de giberelinas y sustrato Sobre la Germinacion de Semillas de Chincuya (*Annona purpurea* Moc & Sesse). En: *Memorias del congreso Internacional de Anonaceas*. Universidad de Ciencias y Artes del Estado de Chiapas, Tuxtla Gutierrez, Chiapas, Mexico, pp 102 – 122.
- Hernandez, L.V. 1983. La reproducción Sexual Multiplication Vegetativa de las Anonaceas. Universidad Veracruzana, Vera Cruz, Mexico, pp. 102-122.
- Herrera, J. y R. Alizaga. 2001. Efecto de la temperatura de almacenamiento y del contenido de humedad sobre la viabilidad de la semilla de ronrón (*Astronium graveolens* Jacq.) *Tecnología en Marcha*, 14(2):90-96.
- Hepher, A. y J. Roberts. 1985. The control of seed germination in *Trollius ledebouri*: the breaking of dormancy. *Planta* 166: 314–320.
- Hilhorst, H.W.M. 1995. A critical update on seed dormancy. Primary dormancy. *Seed Sci Res* 5: 61–73.
- Hopkins, W.G. 1999. The role of hormones in plant development. In: *Introduction to plant physiology*. 2.ed. New York: John Wiley & Sons. p. 104-110.
- Hoyos, J. 1989. *Frutales en Venezuela*. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Monografía 36, pp. 35–48.
- Hong, D.T. y R.H. Ellis. 1996. A protocol to determine seed storage behavior. Department of Agriculture, The University of Reading, UK.
- Horbowicz M. y R. Obendorf. 1994. Seed desiccation tolerance and storability: dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols—review and survey. *Seed Science Research* 4: 385-405.

- Hong, T.D., S. Linington y R.H. Ellis, 1996. Seed storage behaviour: a compendium. Handbooks for genebanks No. 4. International Plant Genetic Resources Institute, Roma. 62 p.
- Hubbard, N. L., D. Pharr y S. Huber. 1991. Sucrose phosphate synthase and other sucrose metabolizing enzymes in fruits of various species. *Plant Physiol.* 82: 191-196.
- Ikuma, H. y K. Thimann. 1963. The role of the seedcoats in germination of photosensitive lettuce seeds. *Plant and Cell Physiology* 4, 169–185
- Ingle, J. y R. Hageman. 1965. Metabolic Changes Associated with the Germination of Corn III. Effects of Gibberellic Acid on Endosperm Metabolism. *Plant Physiol.* 40:48-53.
- Bernal-Lugo, I. y A. Carl Leopold. 1992. Changes in Soluble Carbohydrates during Seed Storage. *Plant Physiol.* 98, 1207-121
- Iyare, O. A. y B. Ekwukana. 1992. Changes in the activities of carbohydrate-degrading enzymes with ripening in *Musa paradisiaca*. *J. Sci. Food Agric.* 58: 173-176
- Jaya, T. y L. Venkataraman. 1981. Changes in carbohydrate constituents of chickpea and greengram during germination. *Food Chem* 7(2):95.
- Job, C., L. Rajjou, Y. Lovigny, M. Belghazi y D. Job. 2005. Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination. *Plant Physiology* 138, 790–802.
- Johansen, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw- Hill Book Company. London.
- Joseph, L.M., T. Tan y S. Wong. 1998. Antifungal effect of hydrogen peroxide and peroxidase of spore germination and mycelial growth of *Pseudocercospora* species. *Can. J. Bot.*, 76, 2119–2124.
- Judd, W.S., C. Campbell, E. Kellogg y P. Stevens. 1999. *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. Massachusetts: Sinauer Associates. 598p.
- Jubes, J.T., H. Martinez, E. Padilla, C. Oeste. 1975. Effects of mechanical scarification, substrate, seed position and gibberellic acid on germination of cherimoya. *Rev. Agron. Noreste Argent.* 12, 161-172.
- Karssen, C.M. 1968. The light promoted germination of the sedes of *Chenopodium album* L.; II. Effects of (RS)—abscisic acid. *Acta Bot Neerl* 17: 293–308.
- Karssen, C.M. 1976. Uptake and effect of abscisic acid during induction and progress of radicle growth in seeds of *Chenopodium album*. *Physiol Plant* 36: 259–263.
- Kaufman, P.B., N. Ghosheh, J. Lacmix, S. Soni y H. Ikuma, H. 1973. Regulation of invertase levels in *Avena* stem segments by gibberellic acid, sucrose, glucose, and fructose. *Plant Physiol.* 52, 221-228.
- Khetarpaul, N. y B. Chauhan. 1990. Effect of germination and fermentation on available carbohydrate content of pearl millet. *Food Chem* 38:21-26.

- Kireyko, A., I. Veselova y T. Shekhovtsova. 2006. Mechanisms of peroxidase oxidation of *o*-dianisidine, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, and *o*-phenylenediamine in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 32, 71-77
- Kigel, J. y G. Galili. 1995. Seed development and germination. 2 ed. New York: Plenum. 853p.
- Kornberg, H. y H. Beevers. 1957. The glyoxylate cycle as a stage in the conversion of fat to carbohydrate in castor bean. *Biochim. Biophys. Acta.* 26: 531-537
- Koops, A. y H. Groeneveld. 1990. Mobilization of endosperm reserves and uptake of sucrose and valine by the cotyledons of *Euphorbia lathyris* L. *Journal of Experimental Botany* 41: 1279-1285.
- Koornneef, M., L. Bentsink, L. y H. Hilhorst. 2002. Seed dormancy and germination. *Curr Opin Plant Biol* 5,: 33-36.
- Kon, S., A. Olson, D. Frederick, S. Egging y J. Wagner. 1973. Effect of different treatments on phytate and soluble sugars in California small white beans (*Phaseolus vulgaris*). *J Food Sci* 38:215.
- Kooiman, P. 1960. On the occurrence of amyloids in plant seeds. *Acta Botanica Neerlandica*, N° 9. pp 208- 219.
- Koornneef, M., L. Bentsink y H. Hilhorst. 2002. Seed dormancy and germination. *Current Opinion. Plant Biol.* 5, 33-36.
- Kranner, I., R. Beckett, S. Wornik, M. Zorn y H. Pfeifhofer. 2002. Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. *The Plant Journal* 31, 13-24.
- Kranner, I., S. Birtic, K. Anderson y H. Pritchard. 2006. Glutathione half-cell reduction potential: A universal stress marker and modulator of programmed cell death? *Free Radicals in Biology and Medicine* 40, 2155-2165.
- Kranner, I. y S. Birtic. 2005. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integrative and Comparative Biology* 45, 734-740.
- Krock, B., S. Schmidt, C. Hertweck y I. Baldwin. 2002. Vegetation derived abscisic acid and four terpenes enforce dormancy in seeds of the post-fire annual, *Nicotiana attenuata*. *Seed Sci Res* 12: 239-252.
- Krishnan, H. S., J.T. Slanchette y T.W. Okita, 1955. Wheat invertases. characterization of cell wall-bound and soluble forms. *Pl. Physiol.*, 7S: 241-245.
- Kriedemann, P. y H. Beevers. 1967. Sugar Uptake and Translocation in the Castor Bean Seedling II. Sugar Transformations During Uptake *Plant Physiol.* 1967 Feb; 42(2):174-80.
- Kuo, J., H. Iizumi, B. Nilsen y K. Aioi. 1990. Fruit anatomy, seed germination and seedling development in the Japanese sea grass *Phyllospadix* (*Zosteraceae*). *Aquat Bot* 37: 229-245
- Krishna Chaitanya, K.S., S. Keshavkant y S. Naithani. 2000. Changes in total protein and protease activity in dehydrating recalcitrant sal (*Shorea robusta*) seeds. *Silva Fennica* 34(1): 71-7

- Koster, K. 1991. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiology* 96: 302-304.
- Lamb, C. y R. Dixon. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 251–275.
- Leubner-Metzger, G., C. Frundt, R. Vogeli-Lange y F. Meins. 1995. Class I β -1,3-glucanase in the endosperm of tobacco during germination. *Plant Physiol* 109: 751–759.
- Leubner-Metzger, G. 2003. Functions and regulation of β -1,3-glucanase during seed germination, dormancy release and after-ripening. *Seed Sci Res* 13: 17–34.
- Leubner-Metzger, G. y F. Meins. 1999. Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2). pp. 49–76 in Datta, S.K.; Muthukrishnan, S. (Eds) *Pathogenesis-related proteins in plants*. Boca Raton, Florida, CRC Press
- Leubner-Metzger, G. y F. Meins. 2000. Sense transformation reveals a novel role for class I β -1,3-glucanase in tobacco seed germination. *The Plant Journal* 23, 215–221
- Lemos, E.E.P., R.L.R.R. Cavalcanti, A.A. Carrazoni y T.M. Lobo. 1987. Germinação de sementes de pinha submetidas a tratamentos para quebra de dormência. *Anais Congresso Brasileiro de Fruticultura*. 2(9), 675- 678.
- Lemos, E.E.P., R.L.R.R. Cavalcanti, A.A. Carrazoni y T.M.L. Lobato. 1988. Germinação de sementes de pinha submetidas a tratamentos para quebra de dormência. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., 1988, Campinas. *Anais. Campinas: Sociedade Brasileira Fruticultura*, v.2, p. 675 - 678.
- Leopold, A.C. 1983. Volumetric components of seed imbibition. *Plant Physiology*, v.73, p.677-680,
- Leprince O., R. Bronchart y R. Deltour. 1990. Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* L. seed. *Plant, Cell and Environment* 13: 539-546.
- Lichtenthaler, H. 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, Inc 148, 350-382.
- Linkies, A., U. Schuster-Sherpa, S. Tintelnot, G. Leubner-Metzger y K. Muller. Peroxidases identified in a subtractive cDNA library approach show tissue-specific transcript abundance and enzyme activity during seed germination of *Lepidium sativum*. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 61, No. 2, pp. 491–502
- Liu, P., N. Koizuka, T. Homrichhausen, J. Hewitt, R. Martin y H. Nonogaki. 2005. Large-scale screening of *Arabidopsis* enhancer-trap lines for seed germination-associated genes. *Plant J.* 41: 936–944.
- Lima-Brito, A., V. Campos, J. Santana, y A. Dornelles. 2006. Efeito do ácido giberélico (GA3) na emergência de plântulas de *Annona crassiflora* Mart.,

- Annona squamosa* L. e *Annona muricata* L. Magistra, Cruz das Almas-BA, v.18, n.1, p.27-33.
- Lotero, A. 1976. Géneros de la flora de Colombia III, "Anonaceae". Trabajo de grado. Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 87p.
- Lopes, H.M., J. Maria, R. Silva, y M. Malavas. 1996. Influência do potencial osmótico e da temperatura na embebição e no crescimento da radícula de sementes de cebola (*Allium cepa* L.) Revista Brasileira de Sementes, v.18, p.167-172.
- Lobo, M., Ó. Delgado, J. Cartagena, E. Fernández y C. Medina. 2007. Categorización de la germinación y la latencia en semillas de chirimoya (*Annona cherimola* L.) y guanábana (*Annona muricata* L.), como apoyo a programas de conservación de germoplasma. *Agron. Col.* 25(2), 231-244.
- Manz, B., K. Muller, B. Kucera, F. Volke y G. LeubnerMetzger. 2005. Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated in vivo by nuclear magnetic resonance imaging. *Plant Physiology* 138, 1538 –1551
- Masuda, H. y S. Sugawara, 1980. Purification and some properties of cell wall invertases from sugar beet seedlings and slices of mature roots. *Plant Physiol.*, 66: 93-96.
- Matthews, S., A. A. Powell y N. E. Rogerson. 1980. Physiological aspects of the development and storage of pea seeds and their significance to seed production. In *Seed Production* (ed. P. D. Hebblethwaite). Butterworths, London, England. p. 513-525.
- Mayer, AM. y A. Poljakoff-Mayber. 1989. *The germination of seeds*. Oxford, UK. Pergamon Press. 270 p.
- Magalhães, O., R. de Oliveira, S. de Oliveira, Santos, V. y da Silva, J. 2009. Armazenamento de sementes de *Annona squamosa* L. *Biotemas*, 22 (4): 33-44
- Menegazzo, M., Conceição, A., Oliveira, Kulczynski, S. y Da Silva, E. 2012. Efeitos de métodos de superação de dormência em sementes de pinha (*Annona squamosa* L.). *Revista Agrarian* v.5, n.15, p.29-35, 2012.
- Morales, A., Cueva, B., Aquino, P. 2004. Genetic diversity and geographic distribution of *Annona cherimola* in Southern Ecuador. *Lyonia*. 7:159-170.
- Moreno, M. 2011. Efecto De Algunos Tratamientos Pregerminativos En La Germinación De Semillas De Anón (*Annona squamosa* L.) (ANNONACEAE). Tesis de grado Biología. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. 36p.
- Morton, J. 1987. Sugar apple (*Annona squamosa*). pp. 69-72. En: Morton, J. (ed.). *Fruits of warm climates*. Creative Resources Systems, Miami.
- Moreno, R., I. Luna y R. Gonzalez. 1999. Estudios sobre la germinación de *Annona lutescens*. En: *Memorias del II Congreso Internacional de Anonáceas*. Universidad de Ciencias y Artes del Estado de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. pp. 82.

- Medlicott, A. P., S. Reynolds y A. Thompson. 1986. Effects of temperature on the ripening of mango fruit (*Mangifera indica* L. varo Tommy Atkins). *J. Sci. Food Agric* 37: 469-474.
- Mishra, B., M. Singh, P. Aggrawal y A. Laxmi. 2009. Glucose and Auxin Signaling Interaction in Controlling *Arabidopsis thaliana* Seedlings Root Growth and Development. *journal.pone* 4(2): e4502.
- Moore, R.P. 1985. Tetrazolium testing Manual. International Seed testing Association, Zurich, 99 p.
- Moreno, R., I. Luna y R. Gonzalez. 1999. Estudios sobre la germinación de *Annona lutescens*. En: Memorias del II Congreso Internacional de Anonáceas. Universidad de Ciencias y Artes del Estado de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. pp. 82.
- Morton, J. 1987. Sugar apple (*Annona squamosa*). pp. 69-72. En: Morton, J. (ed.). Fruits of warm climates. Creative Resources Systems, Miami.
- Morales, A., B. Cueva, P. Aquino. 2004. Genetic diversity and geographic distribution of *Annona cherimola* in Southern Ecuador. *Lyonia*. 7:159-170.
- Morohashi, Y. 2002. Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle protrusion. *J. Exp. Bot.* 53, 1643-1650.
- Moreno, L., S. Crespo, W. Perez, L.M. Melgarejo. 2010. Pruebas bioquímicas como herramientas para estudios en fisiología, pp185 -248. En: L.M. Melgarejo (ed.) Experimentos en Fisiología Vegetal. Primera edición. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. 277p.
- Moller, I., P. Jensen, A. Hansson. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58, 459-481.
- Murillo, J. 2001. Las Annonaceae de Colombia. *Biot. Col.* 2 (1) 49 - 58.
- Murillo, J. y D. Restrepo. 2000. *Las anonáceas de la región de Araracuara* Estudios en la Amazonía Colombiana XX Soporte Editorial, Bogotá, 218 pp
- Murata, T., T. Akazawa, S. Fukuchi. 1968. Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. I. An analytical study. *Plant Physiology* 43, 1899-1905.
- Muller, K., S. Tintelnot y G. Leubner-Metzger. 2006. Endosperm-limited Brassicaceae seed germination: Abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 47: 864-877.
- Muntz, K., M. Belozersky, Y. Dunaevsky, A. Schlereth y J. Tiedemann. 2001. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany* 52: 1741-1752.
- Nakasone, H. y R. Paull. 1998. Tropical fruits. Crop production science in horticulture series. CAB International, Londres. pp. 45-75.
- Nautiyal, A.R. y A. Purohit. 1985. Seed viability in sal. Physiological and biochemical aspects of ageing in seeds of *Shorea robusta*. *Seed Sci. Technol.* 13: 69-76.

- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* 153, 257-262.
- Nepomuceno Costa, P., S. Bueno y G. Ferreira. 2011. Fases da germinação de sementes de *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. RAINER em diferentes temperaturas. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP*, v. 33, n. 1, p. 253-260
- Nikolaeva, M.G. 1977. Factors controlling the seed dormancy pattern in the physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. Nort Holland, Amsterdam. pp. 51-74.
- Nikolaeva, MG. 1967. Physiology of deep dormancy in seeds. National Science Foundation, Washington, DC, USA. 219p
- Nikolaeva, MG. 2004. On criteria to use in studies of seed evolution. *Seed Science Research* 14: 315–320.
- 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 (5), 473-483.
- Novod, 2009. 4th R and D report on tree borne oilseeds. Novod Board India. <http://www.novodboard.com/4th%20RandDReport.pdf>
- Norman, E. M., K. Rice, S. Cochran. 1992. Reproductive biology of *Asimina parviflora* (Annonaceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 119(1):1-5
- Obizaba, I. y H. Egbuna. 1992. Effect of germination and fermentation on the nutritional quality of bambara nut (*Voandzeia subterranea* L. Thouans) and its product (milk). *Plant Foods Hum Nutr* 42:13-23.
- Obroucheva, N. y O. Antipova. 1997. Physiology of the initiation of seed germination. *Russian Journal of Plant Physiology* 44: 250-264.
- Obendorf, R. L., 1997, Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Sci. Res.*, 7: 63-74.
- Oliveira, de M., I, Cavalcante, A. Martins. 2006. Armazenamento de sementes de doviális (*Dovyalis caffra*). *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v.28, n.3, p.539-541.
- Oliveira, J.C., R. Sader y R.A. Zampieri. 1984. Efeito da idade sobre a emergência e vigor de sementes de maracujá amarelo. *Rev. Bras. Sem.* 6(2), 37-43.
- Olczak, M., E. Niziol, W. Widlak y B. Morawiecka. 1992. The activity of acid phosphatase and the level of storage proteins during the early stages of germination of *Lupinus luteus* L. and *Lupinus angustifolius* L. seeds. *Acta Soc Bot Pol* 61:177-185
- Oliveira, I., R. Andrade y A. Martins. 2005. Influência da temperatura na germinação de sementes de *Annona montana*. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP*, v. 27, n. 2, p. 344-345,
- Ono, E. O., J. Rodrigues, J. Sabino, y S. de Pinho. 1993. Estudo da embebição e da viabilidade de sementes de macadâmia (*Macadamia integrifolia* MAIDEN & BETCHE). *Scientia Agrícola, Piracicaba*, v.50, n. 1, p. 40 – 44,

- Oracz, K., H. Bouteau, J. Farrant, K. Cooper, M. Belghazi, C. Job, D. Job, F. Corbineau y C. Bailly. 2007. ROS production and protein oxidation as novel mechanisms for seed dormancy alleviation. *The Plant Journal* 50, 452–465.
- Palmiano, E. y B. Juliano. 1972. Biochemical changes in the rice grain during germination. *Plant Physiology* 49, 751–756
- Padilla, I. y C.L. Encina. 2003. *In vitro* germination of cherimoya (*Annona cherimola*) seeds. *Scientia Hort.* 97, 219-227.
- Pawshe, Y.H., Patil, B.N. y Patil, L.P. 1997. Effect of pregermination seed treatment on the germination and vigour of seedlings in custard apple (*Annona squamosa* L.). *Annals of Plant Physiology*, v. 11, n. 2, p. 150-154,
- Peterbauer, T., Richter, A. 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Sci Res.* 11:185–97.
- Petruzzelli, L., K. Muller, K. Hermann, K. y G. Leubner-Metzger. 2003. Distinct expression patterns of b-1,3-glucanases and chitinases during the germination of solanaceous seeds. *Seed Sci Res* 13: 139–153.
- Pérez-García, F. y M. Pita Villamil. 2001. Viabilidad, Vigor, longevidad y conservación de semillas. Hojas divulgadoras; 2112 HD.
- Pereira, M. F., L. Bandeira, A. Blanco, A. Ciampi y A. Coelho. 2008. Development of microsatellite markers in *Annona crassiflora* Mart., a Brazilian Cerrado fruit tree species", *Molecular Ecology Resources* 8 (6): 1329.
- Pereira, T. y A. de Andrade. 1994. Germinação de *Psidium guajava* L. e *Passiflora edulis* Sims - efeito da temperatura, substrato e morfologia do desenvolvimento pósseminal. *Rev. Bras. Semen.* 16(1), 58-62.
- Peterbauer, T. y A. Richter. 2001, Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Sci. Res.*, 11: 185-197.
- Periasamy, K. 1962. The ruminant endosperm: development and types of rumination. - In: *Plant embryology. A symposium*, pp. 62-74. - New Delhi, India: Council of Scientific and Industrial Research.
- Pinto, A.C., y Silva, E.M. 1975. Influencia de Hormono Sobre o Poder Germinativo de Sementes de Graviola (*Annona muricata* L.). In: *Anais do III Congresso Brasileiro de Fruticultura*, V. II. Sociedade Brasileira de Fruticultura, Rio de Janeiro, Brasil, pp. 415-421.
- Pinto, A.C. 1976. Influência de hormônio sobre o poder germinativo de sementes de graviola. *Congresso Brasileiro De Fruticultura*, 3., 1975, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Fruticultura, p.415-420.
- Pinto, A.C., S.R.M. Andrade. 2005. Chapter 9. Genetic improvement. pp. 53-69. En: Williams, J.T., R.W. Smith, A. Hughes, N. Haq y C.R. Clements (eds.). *Annona Species*. International Centre for Underutilised Crops. University of Southampton, Southampton.
- Pinto, A.C. 2005a. Chapter 3: Origin and distribution. pp. 17-20. En: Williams, J.T., R.W. Smith, A. Hughes, N. Haq, C.R. Clements. (eds.). *Annona species*. International Centre for Underutilized Crops, University of Southampton.

- Pinto, A.C. 2005b. Chapter 10. Agronomy. pp. 70-123. En: Williams, J.T., R.W. Smith, A. Hughes, N. Haq y C.R. Clements. (eds.). *Annona species*. International Centre for Underutilized Crops, University of Southampton, Southampton.
- Pinto A, M., S. Cordeiro, F. Andrade, F. Ferreira, H. Filgueiras y R. Alves. 2005. *Annona species*. International Centre for Underutilised Crops.
- Pinto, A. Q. y P. Genu. 1984. Contribuição do estado técnico-científico da graviola (*Annona muricata* L.). Anais do 7º Congresso Brasileiro de Fruticultura, Florianópolis, Brasil, p.529-564.
- Popenoe, W. 1974. The Annonaceous fruits:. In: W. Popenoe (Editor). *Manual of Tropical and Subtropical Fruits*. Hafner Press. New Yorkr:. pp. 16 1- 195.
- Poulsen, G., C. Holten y R. Von Bohmer, 2006. Identification and revival of low viability seed simples. *Genet Resources Crop Evolution* 53, 675-678.
- Powell, A.A. y S. Matthews.1981.Evaluation of controlled deterioration, a new vigour test for small seeds vegetables. *Seed Sci. Technol.* 9(3), 633-640.
- Popinigis, F. 1985. *Fisiologia da semente*. 2. ed. Agiplan, Brasília. 289 p.
- Prabhakar, B.S. y R. Mukherjee. 1980. Effects of crop season and seed protein level on the viability of rice seeds. *Ind. J. Agric. Sci.* 50(10): 756–760.
- Prodanović, P., Prodanović, R., Bogdanović, J., Mitrović, A Milosavić, N., Y Radotić, K. 2007. Antioxidative enzymes during germination of two lines of serbian spruce [*Picea omorika* (PANČ.) Purkyně]. *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, 59 (3), 209-216
- Pulecio, L. 2011. Efecto de la aplicación de etileno, escarificación química, diferentes sustratos y secado sobre viabilidad y germinación de semillas de anón común (*Annona squamosa* L). Tesis de grado Biología. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. 56p.
- Rao, P. R. 1975. Seed anatomy of *Artabotrys odoratissimus* with a discussion on chalaza, integumentary bundles and ruminant endosperm. - *Phytomorphology* 25: 215- 228.
- Rao, P. R. 1979. Seed and fruit anatomy in *Polyalthia longifolia* (*Annonaceae*). - *Bot. Jahrb. Syst.* 101: 83-89.
- Rao, P. R. 1982. Seed and fruit anatomy in *Asimina triloba*, with a discussion on the affinities of *Annonaceae*.- *Bot. Jahrb. Syst.* 103: 47-57.
- Rajjou L, Gallardo K, Debeaujon I, Vandekerckhove, J. 2004. The effect of alpha-amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiol.* 134: 1598-1613.
- Rao, N.K., J. Janson, M.E. Duloo, K. Ghosh, D. Nowell y M. Larinde. 2006. *Manual of seed handling in genebanks*. Handbook for genebanks 8, 163 p.
- Rajput, C. 1985. Custard apple. pp. 479-486. En: Bose, T. (ed.). *Fruits of India tropical and subtropical*. Department of Horticulture, India.
- Ranal, M. y D.G. de Santana. 2006. How and why to measure the germination process? *Revista Brasil. Bot.* 29(1), 1-11.

- Reino, J., Y. González y J. A. Sánchez. 2008. Optimum germination temperature and imbibition patterns of the seeds from *Albizia lebbbeck*, *Gliricidia sepium* and *Bauhinia purpurea*. Pastos y Forrajes, Vol. 31, No. 3,
- Ren, C.W. y A. Kermodé. 2000. An increase in pectin methyl esterase activity accompanies dormancy breakage and germination of yellow cedar seeds. *Plant Physiology* 124, 231–242
- Rizzini, C. T. 1973. Dormancy in seeds of *Annona crassiflora* Mart. *Journal of Experimental Botany*, 24 (78): 117-123.
- Rosseto, C.A.V., A. Novembre, A. da, J. Marcas Filho, W. Da Silva y J. Nakagawa. 1997. Efeito da disponibilidade hídrica do substrato, da qualidade fisiológica e do teor de água inicial das sementes de soja no processo de germinação. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 54, n. 1 – 2, p. 97 – 105.
- Rolland, F., E. Baena-Gonzalez, J. Sheen. 2006. Sugar sensing and signalling in plants, conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:675–709.
- Rogers, J.C., D. Dean y G. Heck. 1985. Aleurain: a barley thiol protease closely related to mammalian cathepsin H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82, 6512-6516.
- Salisbury, F.B. y C. Ross. 1994. Fisiología vegetal. Trad. De V. G. Velázquez. Mexico: Grupo Editorial Iberoamérica, 759p.
- Samsbery, R. y D. Banerjee. 1979. Some biochemical changes accompanying loss of seed viability. *Plant Biochem. J.* 6: 54–63.
- Sánchez, D. 1987. Revisión de las especies colombianas de la sección *Chasmantha* del género *Guatteria* (Annonaceae). Tesis de Maestría en Botánica Sistemática Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 140pp
- Sánchez, R.A. y L. de Miguel. 1997. Phytochrome promotion of mannan-degrading enzymes in the micropylar endosperm of *Datura ferox* seeds requires the presence of the embryo and gibberellin synthesis. *Seed Sci. Res.* 7, 27-33.
- Santana, A., y R. de Cavalho. 2006. Viabilidade e capacidade de armazenamento de sementes de carqueja em tres municipios no Parná. *Scientia Agrária* 7(2), 15-20
- Santos, C.M., N.L. Menezes y F.A. Villela. 2005. Physiologic and biochemical alterations in artificially aged bean seeds. *Rev. Brasil. Sementes* 27(1), 104-114.
- Sanewski, E.T. 1991. Classification and cultivars. In: Custard apples: cultivation and crop protection. 2 ed. Austrália: Queensland Department of Primary Industries, P 2-11.
- Satyanarayana, B., P. Subhashinidevi y A. Arundhati. 2011. Biochemical Changes During Seed Germination of *Sterculia urens* Roxb. *Not Sci Biol*, 2011, 3(3):105-108
- Setten, K. y J. Koek-Noorman. 1992. Fruits and seeds of Annonaceae. Morphology

- and its significance for classification and identification. *Bibliotheca Botanica*, v.142, p.1-101.
- Selle, M., E. Gonzales de Mejia, L. Elias y R. Bressani. 1983. Evaluación de algunas características químico – nutricionales de la semilla del árbol de hule (*Hevea brasiliensis*). *Archivos Latinoam. Nutric.* 33 (4), 884-901.
- Scalon, S., H. Scalon Filho, y M. Rigoni. 2004. Armazenamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia uvalha*). *Ciência Agrotecnologia*, Lavras, v.28, n.6, p.1228-1234.
- Scofield, G., N. Aoki, T. Hirose, M. Takano, C. Jenkins y R. Furbank. 2007. The role of the sucrose transporter, OsSUT1, in germination and early seedling growth and development of rice plants. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 58, No. 3, pp. 483–495.
- Scott-Craig, J., K. Kerby, B. Stein y C. Sommerville. 1995. Expression of an extracellular peroxidase that is induced in barley (*Hordeum vulgare*) by the powdery.
- Schroeder, C.A. 1951. Fruit morphology and anatomy of the cherimoya. *Botanical Gazette*, v.112, n.4, p.436-446.
- Schmidt, L. 2000. Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed. Danida Forest Seed Centre, Humlebaek, Denmark.
- Schopfer, P. y C. Plachy. 1984. Control of seed germination by abscisic acid. II. Effect on embryo water uptake in *Brassica napus* L. *Plant Physiol* 76: 155–160.
- Schopfer, P. y C. Plachy. 1985. Control of seed germination by abscisic acid. III. Effect on embryo growth potential (minimum turgor pressure) and growth coefficient (cell wall extensibility) in *Brassica napus* L. *Plant Physiol* 77: 676-686
- Schopfer, P. y C. Plachy. 1993. Photoinhibition of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination: control of growth potential by cell-wall yielding in the embryo. *Plant, Cell and Environment* 16, 223– 229.
- Schopfer, P., C. Plachy. y G. Frahy. 2001. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiol.* 125, 1591-1602.
- Schlereth, A., C. Becker, C. Horstmann, J. Tiedemann y K. Muntz. 2000. Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axis and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* 51: 1423–1433.
- Shahidul Islam, R., R. Carvajal, R. Carmen y O. Garner, 2008. Physiological and Biochemical Variations in Seed Germination of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) Cultivars. *American Journal of Plant Physiology*, 3: 16-24.
- Sierra, J. 2005. Fundamentos para el establecimiento de pasturas y cultivos forrajeros. Universidad de Antioquia.

- Singh, A. 2004. The physiology of salt tolerance in four genotypes of chickpea during germination. *J. Agric. Sci. Technol.*, 6: 87-93.
- Silva, E., D. Melo, A. Davide, N. Bode, G. Abreu, J. Faria y H. Hilhorst. 2007. Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. *Annals of Botany*, 99: 823-830.
- Smeekens, S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 49–81.
- Smith, K., N. Silvernail, K. Roders, M. Castro, R. Parcher y T. Elgren. 2002. Soil-gel encapsulated peroxidase: a catalytic material for peroxidation. *Journal of the American Chemical Society* **124**: 4247-4252
- Somogyi, M. 1952. Notes of sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195, 19-23.
- Solis, A. 2006. Algunos Factores que influyen sobre la germinación de semillas de Borraja (*Borago officinalis* L.). Universidad de Concepción. Facultad de Agronomía. Chile.
- Sousa, S. A. 2005. Cultura da Pinheira: caracterização de frutos, germinação e atributos de qualidade requeridos pelo sistema de comercialização. Tesis de maestría en Ciências Agrárias. Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas.
- Sousa, S.A., Pelacani, C.R., Vieira, E.L. y Ledo, C.A.S. 2008. Superação da dormência em sementes de pinha. *Caatinga, Mossoró*, v.21, n.4, p.118-121.
- Spearman, C. 1904. General intelligence, objectively determined and measured. *American Journal of Psychology* 15, 201-293.
- Stewart, C. y H. Beevers. 1967. Gluconeogenesis from amino acids in germinating castor bean endosperm and its role in transport to the embryo. *Plant Physiol* 42: 1587–1595
- Studdert, G.A., W. Wilhelm y J. Power. 1994. Imbibition response of winter to water-filled pore space. *Agronomy Journal*, v.86, p.995-1000.
- Stenzel, N., I. Murata y C. Neves. 2003. Superação da dormência em sementes de atemóia e fruta-do-conde. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal – SP*, v. 25, n. 2, p. 305-308
- Suda, C. y J. Giorgini. 2000. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 12:226-244.
- Sun, W., T. Irving y A. Leopold. 1994. The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. *Physiologia Plantarum* 90: 621-628.
- Svoma, E. 1997. Seed development and function in *Artabotrys hexapetalus* (*Annonaceae*). *Pl. Syst. Evol.* 207:205-223.
- Svoma, E. 1998. Studies on the embryology and gynoecium structures in *Drimys winteri* (*Winteraceae*) and some *Annonaceae*. - *Pl. Syst. Evol.* 21)9: 205-229.

- Swamy, B. 1961: Studies in the *Annonaceae*. II. The development of ovule and seed in *Cananga odorata* and *Miliusa wightiana*. - J. Indian Bot. Soc. 41: 206-216.
- Tan-Wilson, A., X. Liu, R. Chen, X. Qi y K. Wilson. 1996. An acidic amino acid-specific protease from germinating soybeans. *Phytochem* 42:313-319.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2006. *Plant physiology*. Trad. Santarén, R, E. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 719p.
- Teófilo, E. M., S. Silva, A. Bezerra, S. Medeiros Filho, y F. Silva. 2004. Qualidade fisiológica de sementes de aroeira (*Myracrodruom urundeuva* Allemão) em função do tipo de embalagem, ambiente e tempo de armazenamento. *Revista Ciência Agronômica*, 35 (2): 371-376.
- Thompson, K. 2000. The functional ecology of soil seed banks. pp. 215-235. En: Fenner, M. (ed.). *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*. CAB International, Wallingford
- Tiedemnn, J., B. Neubohn y K. Muntz. 2001. Different functions of vicillin and legumin are reflected in the histo pattern of globulin mobilization during germination of vetch (*Vicia sativa* L.). *Planta* 211: 1-12
- Tommasi, F., C. Paciolla, M. de Pinto, L. De Gara. 2001. A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. *Journal of Experimental Botany* 52, 1647-1654.
- Toll-Jubes J., H. Martínez, E. Padilla y C. Oeste. 1975. Efectos de escarificación, medio, posición de siembra y ácido gibberélico, sobre la germinación de semillas en chirimoya (*Annona cherimolia* Mill.). *Rev. Agron. N.O. Argent.* 12(1-2):161-172.
- Toledo, F.F. y J. Filho. 1977. *Manual das sementes: tecnologia da produção*. São Paulo: Agronômica Ceres 224p.
- Tsung, Min., A. Kuo, Cadance, L. Patrick, T. Smith. 1997. Changes in soluble carbohydrates and enzymic activities in maturing soybean seed tissues. *Plant Science* 125 (1997) 1-11
- Tsung, Min Kuo., C. Douglas y C. Crawford. 1990. Sugar Metabolism in Germinating Soybean Seeds. *Plant Physiol.* 93,1514-1520.
- Tybirk, K. 1991. Régénération des légumineuses ligneuses du Sahel. Aarhus Report. 28. Botanical Institute, Aarhus University, Denmark, 86 p.
- Vargas, M. E. 1986. Efecto del ácido giberlico y 6-bencill-amino-purina, sobre la germinación de semillas de chirimoyo (*Annona cherimoya* Mill.) cv. Bronceada. Tesis ingeniero Agronomo. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía, Chile.
- Vazquez-Yanes, C. y A. Orozco-Segovia. 1993. Fisiología y ecología de semillas de árboles de la selva tropical. Un reflejo de su ambiente. *Ciencia* 35(1): 191-201.
- Van Vuuren, J. y A. Lubbe. 2000. The influence of temperature on the germination of seed of a commercial verbena hybrid. *Acta Hort. (ISHS)* 515:185-192

- Vertucci, C.W. y J.M. Farrant. 1995. Acquisition and Loss of Desiccation Tolerance. In: Seed Development and Germination, Kigel, J. and G. Galili (Eds.). Marcel Dekker, Inc., New York. pp: 872-872.
- Veiga, A., R. Quimarães, S. Rosa, E. Von Pinho, I. Silva y A. Veiga. 1997. Armazenabilidade de sementes de cafeeiro colhidas em diferentes estádios de maturação e submetidas a diferentes métodos de secagem. *Revista Brasileira de Sementes*, v.29, n. 1, p.83-91
- Victoria J. C. Bonilla y M. Sánchez. 2007. Morfoanatomía y efecto del secado en la germinación de semillas de caléndula y eneldo. *Acta Agron.* v.56 n.2
- Villamil, H., G. Corchuelo, y M. De Valencia.1999. Morfología, anatomía de la semilla y composición química del endospermo de *Annona muricata* L. *Agronomía Colombiana*. 16(1-3): 19-23
- Villela, F. y W. Peres. 2004. Secagem e beneficiamento de sementes. En: Ferreira, A., Borguetti, R. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed,. p.265-281
- Wang, H., Q. Qi, P. Schorr, A. Cutler, W. Crosby y L. Fowke. 1998. ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J.* 15, 501–510.
- Wagner, J.A., R. S. Alexandre, J. R. da Silva, L. Duarte, J. O. da Costa, C.H. Bruckner. 2006. Influência do substrato na germinação e desenvolvimento inicial de plantas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg). *Ciênc. agrotec.* 30(4), 643-647.
- Werker, E. 1997. Seed anatomy. Berlin: Gebrüder Borntraeger. 424 p.
- Welbaum, G.E., K. Bradford, K. Yim, D. Booth y M. Oluoch. 1998. Biophysical, physiological and biochemical processes regulating seed germination. *Seed Science Research* 8, 161–172.
- Weaver, R. J. 1987. Reguladores del crecimiento de las plantas em la agricultura. 5.ed. México: Trillas, 622p.
- Woodstock, L.W. 1988. Seed imbibition—a critical period for successful germination. *Journal of Seed Technology* 12: 1–15.
- Wunkshaus, R. 1990. Efecto de la temperatura, época de siembra y de la aplicación de los fungicidas Mancozeb y dicloran sobre la germinación de semillas de chirimoyo (*Annona cherimoya* Mill.). Tesis ingeniero Agronomo. Universidad Catolica de Valparaiso, Facultad de Agronomía, Chile.
- Xu, D.P., S. Shi-Jean y C.C. Black, 1989. Sucrose metabolism in Lemma vean seeds. *Plant Physiol.*, 89: 1106-1116.
- Xu, J., X. Qian, X. Wang, R. Li, X. Cheng, Y. Yang, J. Fu, S. Zhang, G. King, J. Wu y K. Liu. 2010. Construction of an integrated genetic linkage map for the A genome of *Brassica napus* using SSR markers derived from sequenced BACs in *B. rapa*. *BMC Genomics* 11: 594.
- Yoshida, K., S. Tsurushiin, H. Fukuba, T. Tadokoro, A. Maekawa. 1997. Changes in protein content and enzyme activity in black matpe organs during

- germination Nippon-Eiyo- Shokuryo-Gakkaishi. J Japanese Soc Nutr Food Sci 50:153-159.
- Yuan, K. y J. Diller. 2006. Phytohormone signalling pathways interact with sugars during seed germination and seedling development. *J Exp Bot* 57:3359–3367.
- Yun, C., J. Fangfang, X. Hong, L. Jiansheng y Z. Jianhua. 2005. The Regulator of G-Protein Signaling Proteins Involved in Sugar and Abscisic Acid Signaling in Arabidopsis Seed Germination. *Plant Physiology*, January 2006, Vol. 140, pp. 302–310.
- Zeinalabedini, M., K. Majourhat, J. Hernandez, F. Dicenta y P. Martinez-Gomez. 2009. Breaking seed dormancy in long-term stored seeds from Iranian wild almond species. *Seed Science and Technology* 37, 267–275.
- Ziegler, P. 1995. Seed development and germination. New York: Marcel Dekker Inc.
- Zor, T. y Z. Selinger. 1996. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity. Theoretical and experimental studies. *Analytical Biochemistry* 236, 302-308
- Zucareli, V., G. Ferreira, E. Silvério y C. Amaro. 2007. Luz e temperatura na germinação de sementes de *Annona squamosa* L. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v.5, supl.2, p.840-842.