

MORFOLOGIA, ANATOMIA DE LA SEMILLA Y COMPOSICION QUIMICA DEL ENDOSPERMO DE *Annona muricata* L.

Morphological, anatomical and chemical characterization of custard apple seed, *Annona muricata* L.

Hector Villamil¹, German Corchuelo R² y Martha de Valencia³

¹ Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. hvillam@bacata.usc.unal.edu.co

² Profesor Asistente, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. AA 14490 Santafé de Bogotá.

³ Profesora, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. AA 14490 Santafé de Bogotá.

RESUMEN

Este trabajo fue realizado para determinar los factores fisiológicos que afectan la germinación de la semilla de guanábana. Se estudió la ontogenia de la semilla para identificar y determinar el origen de la testa, del endospermo ruminado y de los diferentes tejidos del endospermo. Se efectuaron observaciones en cuatro estados de desarrollo de la semilla: muy tierna, tierna, juvenil y madura, en los cuales se realizaron cortes transversal basal, transversal media, longitudinal basal y transmediano mediante un microtomo de congelación cryostat a cinco μ de espesor. Los cortes mostraron que la testa está conformada por fibras longitudinales, transversales y oblicuas, por lo cual actúa como una capa impermeable. El endospermo ruminado está distribuido alrededor del embrión a manera de un sistema de irrigación. La semilla presenta una cavidad hilar que actúa como una válvula higroscópica para regular la humedad interna de la semilla y, además, presenta un tapón micropilar que permite una protección al embrión y a la oxidación del endospermo. En el endospermo, se encuentran lípidos, amilodextrina, amyloide, proteínas y azúcares; además, los lípidos, se determinaron en las diferentes etapas de desarrollo de la germinación, encontrándose un porcentaje del 33%.

Palabras claves: Mesotesta, micrópilo no conspicuo, Tapón estrefilar, amilodextrina, xiloglucano.

Abreviaturas: M: mesotesta; E: Exotesta; Hv: haz vascular; C: Collarete; Ch: Cavidad hilar; Tm: Tapón micropilar; Om: Orificio micropilar; En: Endospermo; R: Ruminaciones; F: Fibras; A: Amilodextrina; Am: Amiloide; Cr: Cristales; L: Lípidos; P: Proteínas; Em: Embrión.

SUMMARY

This study was carried out to determine the physiological factors affecting seed germination of custard apple. The ontogeny of the seed was studied looking for identification and determination of the seed coat, ruminated endosperm, and endosperm tissues. Four development stages of the seed were

considered: very tender, tender, juvenile, and mature. Cross longitudinal, longitudinal medium, cross basal, and longitudinal basal sections were done using the cryostat microtome. Portions of cross sections of seed coat showed the transversal and oblique fibers of this tissue, which constitutes an impermeable layer in the seed. Medium longitudinal sections showed the distribution of the ruminated tissue and the micropilar stopper and the hilum cavity rounded by the collarete were observed. This cavity is the only structure that allows water diffusion through the seed. It was found that the hilum cavity is communicated with the endosperm through little crevices that are formed by the non vascular ruminated tissue. The miniature embryo which is embedded within the endosperm is surrounded by the ruminated tissue. The qualitative chemical composition of the mature endosperm showed the distribution of proteins, starch, lipids, and sugar content. A high content of lipid was detected in these seeds (33%) using the soxhlet extraction method.

Key words: Mesotestal, non conspicuous micropylar, micropylar stopper, amilodextrin, xiloglucan.

INTRODUCCION

La semilla constituye la unidad biológica más importante y definitiva de las plantas superiores. La vitalidad de las semillas varía notablemente con la especie y depende, entre otras cosas, de la cantidad y calidad de sustancias químicas contenidas en el embrión y en los tejidos de reserva, lo mismo que de las estructuras que las protegen para su conservación; cada planta produce sus propias semillas, cuya composición química, constitución genética y organización estructural varían con la especie, (Niembro, 1990).

Las diferentes sustancias químicas contenidas en la semilla son de naturaleza estructural, funcional y de reserva, variando en cantidad, composición y propiedades que son genéticamente determinadas por la planta (Mayber y Poljakiff, 1963 y Mayber, 1963). Las causas que originan el deterioro de dichas sustancias y que conllevan a la pérdida de vigor y de germinabilidad de las

semillas son muy diversas y aún no se conocen por completo (Niembro, 1990).

La guanábana (*Annona muricata* L.) presenta una gran biodiversidad en Colombia y Brasil. La forma más conveniente de propagación es por semilla con porcentajes de germinación cercanos al 60% (Casas *et al.*, 1989). Durante la presente década entre otros factores, el bajo porcentaje de germinación ha sido un limitante para el desarrollo y expansión de huertos comerciales en Colombia.

En la fisiología de semillas, existen dos grandes grupos, semillas ortodoxas y recalcitrantes. Las semillas de la familia Annonaceae, posiblemente, pertenecen a este último grupo, por presentar un alto contenido de lípidos y no admitir una reducción en el contenido de humedad para minimizar respiración, evitar oxidación de los lípidos y, por consiguiente, reducir la pérdida de viabilidad (Niembro, 1990).

Annona muricata L. no ha sido clasificada en variedades y es así como, se encuentran diferentes ecótipos o biótipos, tanto de plantas, como de frutos y de semillas, se han determinado y los tamaños de estas últimas están entre 5 y 20 mm de longitud con un peso promedio de 0,477 g. La semilla de *A. muricata* L. proviene de óvulos anatropos, crasinucelados y bitegumentados, por lo cual se considera como una especie primitiva (Comer, 1976; Niembro, 1983). Comer (1976), Niembro (1983) y Kooiman (1960) mencionan que características estructurales y de composición, tales como la testa, el endospermo de tipo ruminado, alto contenido de lípidos, compuestos como xiloglucanos, válvula higroscópica manejada por tapón estrofiolar son indicadores de simientes primigenias.

El estudio de la semilla de guanábana es de gran utilidad para comprender, en detalle, los procesos asociados con la fisiología de la germinación y, para ello, se establecieron los siguientes objetivos: Determinar, describir e identificar los tejidos que conforman la semilla de guanábana, así como determinar la composición química del endospermo.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron semillas frescas de diferentes tipos de guanábana, provenientes de árboles de cuatro años de edad bajo polinización natural. Los árboles fueron previamente seleccionados en la finca la Esperanza, ubicada en el municipio del Guamo (Tolima) a una altura de 300 m, precipitación pluvial promedio de 1400 mm/año, temperatura promedio anual 29 °C y una Humedad Relativa del 76%.

Se analizó el desarrollo de la semilla con el fin de identificar y determinar los tejidos seminales así: Conformación de la testa, origen y formación del tejido ruminado, opérculo micropilar, hilo, collarete, endospermo y el embrión, sobre cuatro estadios de desarrollo de la semilla: muy tierna, tierna, joven y madura. En cada estado, se realizaron cortes medianos, transmedianos, transversal basal y medio. Esos cortes se realizaron con un microtomo de congelación, cryostat, calibrado a cinco micras de grosor, realizando tinciones con Fast green, Tionina, Lugol, Floruglucina, Azul de metileno, para resaltar los diferentes tejidos (Johansen 1940), Posteriormente fueron analizados al

microscopio óptico, tomando microfotografías para las respectivas mediciones.

La determinación química del endospermo se hizo en semillas maduras secas y en imbibición para resaltar proteínas, grasas, almidón, azúcares, con reactivos como lugol, sudan III, picrico - eosina, reactivo de Shif y se determinó el contenido de lípidos en el desarrollo de la germinación, mediante el método de extracción etérea, soxhlet.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados muestran que la semilla de *Annona muricata* L. se encuentra en un fruto que se deriva de un gineceo apocárpico de una flor con numerosos pistilos, ubicados sobre un receptáculo grande y carnoso, lo cual es característico de un fruto agregado. La semilla es de color pardo oscura, lignificada y con alto contenido de taninos, su forma es oblongoelíptica, obovoide de tamaño variable desde 5*5*2 mm a 20*10*5 mm de largo*ancho*grueso, similar a lo reportado por Comer (1976) y Niembro (1983).

En un fruto se encuentran numerosas semillas y su cantidad es variable según el tipo y, en promedio, se hallaron 93 semillas por kilogramo de fruta, con un peso que varió entre 0,3395 g. y 0,5432 g., en concordancia con lo reportado por Aecio de Castro, (1984).

La semilla presenta una posición pendular unida a una placenta por un funículo bastante fuerte, con haz vascular bastante visible, el cual se proyecta para formar la rafe (figura 1AB y C). Al desconectarse la semilla de la planta, se forma una depresión bastante prominente en el hilo, rodeada por una coronula (collarete) denominada hendidura hilar. Las células de la coronula son fibroescleroides de lumen estrecho, surcadas por células parenquimáticas de lumen amplio y bastante ricas en lípidos (figura 1D). El micrópilo no es conspicuo; en la semilla se presenta en un tapón piramidal formado por células esclerenquimáticas, tipo braquiscleroides, según Esau (1959). El tapón presenta un fino canal que comunica el endospermo con la cavidad hilar, el cual recibe el nombre de tapón u opérculo micropilar (Figura 1E y F). La rafe y el antirafe se encuentran entre los tejidos de la cubierta seminal. La rafe es la región comprendida entre el funículo y la cálaza, ubicada periféricamente y en un plano mediano, contiene más de un haz vascular que finaliza en la cálaza (Figura 2a y 2b). Existen, además, trazas vasculares poscalazales, por lo cual la semilla está rodeada de una banda vascular ubicada en la periferia. Dicha banda se extiende desde el funículo hasta la cálaza y de ésta hasta el micrópilo, lo cual, caracteriza a semillas denominadas pericalazales. (Comer, 1976; Boesewinkel y Boumann, 1984).

La cubierta seminal procede del desarrollo de dos tegumentos presentes en el rudimento seminal. Básicamente, la cubierta se deriva del tegumento externo y, por lo tanto, es una semilla testal. La capa mecánica que da dureza y rigidez a la cubierta de la semilla madura se ubica en la mesotesta, la cual procede de la capa media del tegumento externo. La capa mecánica está constituida por fibras esclerenquimáticas de pared gruesa y

lumen muy estrecho, dispuestas en dos paquetes, a veces tres, orientadas perpendicularmente entre sí, las cuales se lignifican progresivamente en la medida que la semilla crece y estas características son las que le dan la rigidez a la cubierta seminal. (figura 2). El tegumento interno se observa en semillas tiernas y jóvenes y esta constituido por tres capas que contienen taninos, las cuales, al madurar la semilla, se aplastan y no se visualizan (figura 2E y F). La epidermis externa está constituida por células de pared delgada más o menos cuboidales ó tangencialmente más alargadas. La semilla, al secarse, presenta una delgada capa transparente (papelillo) que la cubre y está conformada por la exotesta y restos de fruto.

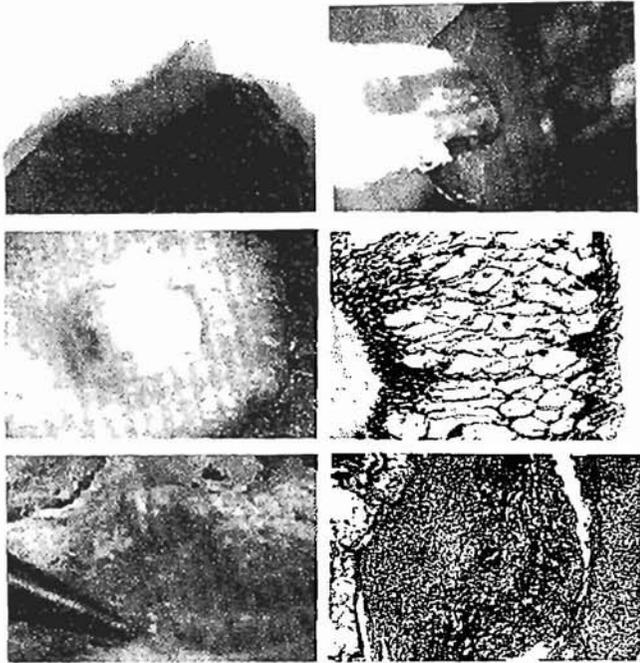


Figura 1. Semilla de guanábana, *Annona muricata* L. A: Adherencia de la semilla al fruto 9.9X. B: Funículo adherido a la semilla 13.2X. C: Cavidad hilar de la semilla 13.2X. D: Microfotografía del collarite 400X. E: Tapón u opérculo micropilar 13.2X. F: Microfotografía del tapón micropilar, coloración Fast green 40X.

La semilla presenta un endospermo albuminoso, abundante, masivo y parenquimatoso, que rodea completamente el diminuto embrión, con paredes celulares poco gruesas y su consistencia es de tipo corneo, caracterizado por tener reservas de hemicelulosa (figura 3). El endospermo presenta agrietamientos, denominados ruminaciones, debido a la penetración de los tegumentos de la cubierta seminal (figura 3C y D). Las ruminaciones están formadas por el tégmen o tejidos mesotestales y se lignifican de igual forma que la testa.

El endospermo ruminado tipo *annona* es típico de las anonáceas según Boesewinkel y Boumann, (1984). Caracterizado por no tener vascularización y porque circunda perfectamente el diminuto embrión, simulando un sistema biológico de irrigación que merece futuras investigaciones sobre esta peculiar distribución y función (figura 3F). Las ruminaciones

comienzan a observarse desde estados muy tempranos de su desarrollo.

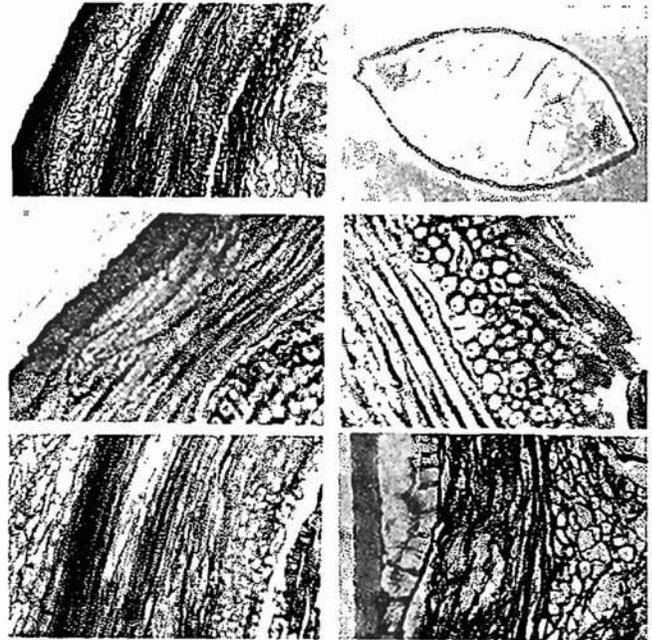


Figura 2. Características internas de la semilla de guanábana, *Annona muricata* L. A: Corte longitudinal de la testa en una semilla joven. Fast green, 100X. B: Corte transmediano de una semilla joven, 13.2X. C y D: Corte longitudinal de la testa de una semilla madura, Tionina, 400X. E: Corte longitudinal de la testa de una semilla tierna, lugol 200X. y F: Corte longitudinal de una semilla tierna 200X.

El endospermo de *A. muricata* esta compuesto por amilodextrina, especialmente en las células periféricas de las ruminaciones del endospermo y, además, se determino presencia de amiloides, lípidos, cristales de calcio y proteínas en el mismo. Estas determinaciones coinciden con lo reportado por Kooiman, (1967), quien encontró, principalmente, amiloide, un xiloglucano compuesto por galactosa, xilosa y glucosa, bastante resistente y formando la parte principal de las paredes celulares y, además, se observa la presencia de galactomananas, sin presencia de material amiláceo y los lípidos son un componente muy importante representando un 33% del peso seco del embrión (figura 4ABC y D). Se estableció una escala de crecimiento de la plántula desde Imbibición hasta la liberación de los residuos de la semilla, así: T: Semilla en imbibición; A: Salida de la punta de la radícula; B: Salida del hipocotilo; C: Crecimiento de raíces secundarias; D: Elongación del hipocotilo; E: Salida de la base de los cotiledones y F: Liberación o caída de la testa y exposición de la primera hoja; para la determinación de lípidos. La figura 5 presenta el consumo de lípidos por parte de la plántula y el remanente de lípidos confirman lo reportado por Kooiman acerca del *annona amyloid* como generador del gran porcentaje de grasas (27%) en las paredes celulares del endospermo. Los

lípidos están compuestos por ácidos saturados en un 24.26% y ácidos grasos insaturados en un 75.72%, principalmente oleico y linoleico (Aecio de Castro, 1984).

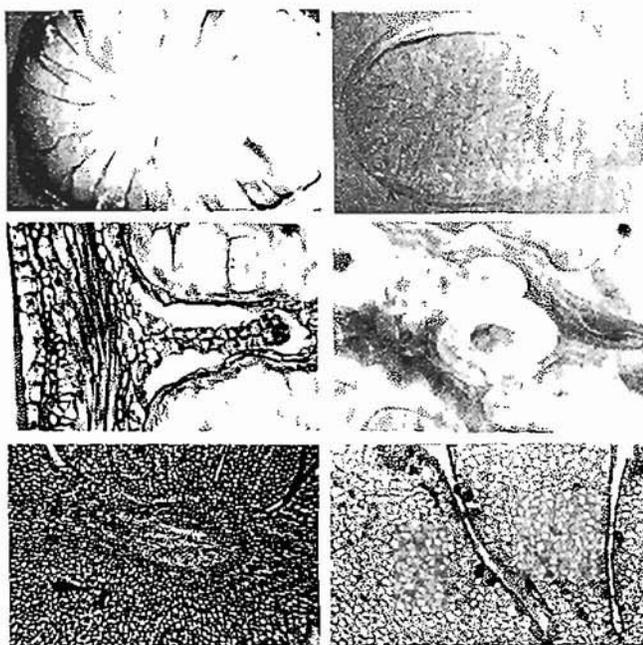


Figura 3. Endospermo ruminado de la semilla de *Annona muricata* L. A: Vista superficial del endospermo con diferentes agrietamientos, 13.2X. B: Panorama del tejido ruminado en corte mediano 13.2X. C: Microfotografía de la penetración del tejido mesotestal en el endospermo en una semilla tierna, 200X. D: Células del tejido ruminado, 1000X. E: Microfotografía del tejido ruminado en una semilla madura 400X. y F: Microfotografía del corte mediano del endospermo maduro, 40X.

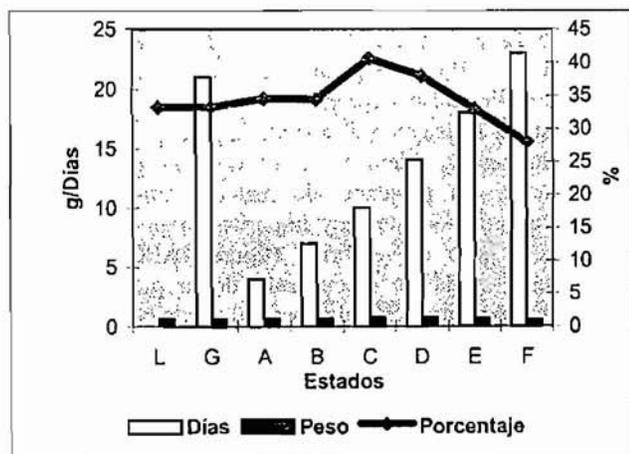


Figura 5. Estados de desarrollo durante el proceso de germinación de *a. muricata* l. y consumo de lípidos
El embrión se encuentra en la parte basal central hacia la zona hilar, protegido de corrientes de aire o agua por el tapón

micropilar. Es pequeño, mide 3 mm, lineal, recto, con dos cotiledones delgados y foliáceolanceolados. Se encuentra embebido en el endospermo. Los cotiledones están separados por una capa delgada de levulosa, semejante a lo reportado por Hayat (1963) en *A. squamosa*. Los cotiledones se van desarrollando dentro del endospermo a medida que se forma la plántula, no son fotosintéticos y son como haustorios para el embrión, los cuales caen junto con la cubierta seminal al formarse la plántula (figura 4E y F). En el embrión, se diferencian, perfectamente, radícula, hipocotilo y cotiledones; su consistencia es carnosa y se desprende fácilmente del endospermo hidratado; sus células son circulares, sin una distribución uniforme, con paredes formadas por amiloide y altos contenidos de lípidos.

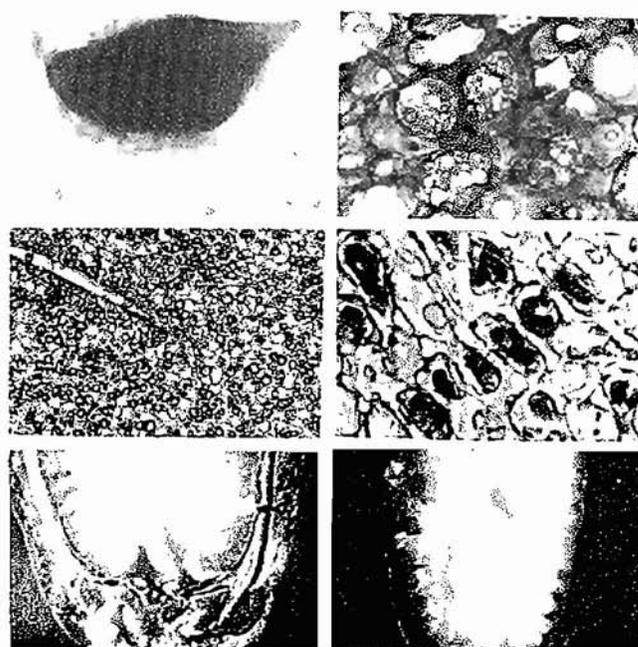


Figura 4. Microfotografía del endospermo de *Annona muricata* L. resaltando las principales sustancias A: Amilodextrina, 400X. B: Amyloide y cristales de calcio. 1000X. C: Lípidos, 200X. D: Proteínas, 1000X. E y F: Características del embrión sin y con imbibición, 13.2X.

LITERATURA CITADA

- AECIO DE CASTRO, F. Características físicas y químicas de la graviola. Pesqui. Agropec. Brasilia, Brasil, pp 361 - 365. 1984.
- BOESEWINKEL, F.D. y BOUMANN, F. The seed: structure. En: Embriology of Angiosperms. B.M. Johri Ed, Berlin, pp 567-608. 1984.
- CORNER, E. The seeds of dycotiledons. Cambridge University Press. Cambridge G.B. V.I 1976.
- HAYAT, A. Morphology of seed germination and seedling in *Annona squamosa*. Botanical Gazette, V. 124, N° 5. pp 360 - 362. 1962.

- JOHANSEN, D. A., Plant microtechnique, McGraw Hill Book Company, 1940.
- KOOIMAN, P. On the occurrence of amyloids in plant seed. Acta Botanica Neerlandica, N° 9. pp 208 - 219. 1960.
- NIEMBRO, A. Semillas de arboles y arbustos, Ontogenia y Estructura. Editorial Limusa S.A. México. 465 p. 1988.
- NIEMBRO, A. Composición química de las semillas y su efecto en la conservación. En seminario taller sobre la investigación de semillas forestales tropicales. Conif. Documento N° 18, Bogotá. pp 111 - 118. 1990.
- ESAU, K. Anatomía Vegetal. Ediciones Omega S.A. Barcelona. 775 p. 1972.