

BIOLOGÍA FLORAL DE LA *Annona muricata* L. EN EL ESTADO LARA, VENEZUELA*

Floral biology of *Annona muricata* L. in Lara State, Venezuela

Miguel Arizaleta-Castillo¹ y Jorge Parés-Martínez¹

RESUMEN

Con el fin de contribuir con el estudio de la biología floral del guanábano (*Annona muricata* L.) en el estado Lara, se caracterizó el período desde la emergencia del botón floral hasta la antesis durante el año 2003. Se determinó además la germinabilidad y viabilidad in vitro de los granos de polen. La antesis se caracterizó mediante observaciones directas en campo, seleccionando flores al azar. Para la germinabilidad se utilizaron dos medios artificiales de incubación: 1. solución de sacarosa al 5 % y 2. 0,2 g/L de H₃BO₃; 1,0 g/L de Ca(NO₃)₂·4H₂O y 50,0 g/L de sacarosa. La viabilidad fue determinada utilizando como colorante azul de anilina en lactofenol al 1%. El período desde la emergencia del botón floral hasta la antesis se extendió 40,04 ± 2,75 días, y presentó una secuencia sincronizada en cinco fases. El medio 2 proporcionó las mejores condiciones para la germinación in vitro del polen, y los granos obtenidos de las fases IV y V presentaron mayor germinación (90,50 y 81,04 % respectivamente). Las fases de apertura floral afectaron la viabilidad del polen. El porcentaje de granos de polen viables fue significativamente mayor (97,75 %) en la fase V, seguido de 90,50 % en la fase IV.

Palabras clave: antesis, germinabilidad de los granos de polen, viabilidad de los granos de polen, guanábano, Venezuela.

ABSTRACT

In order to contribute to the knowledge about floral biology of soursop (*Annona muricata* L.) in Lara state, the period from the emergency of the floral button to the

(*) Recibido: 28-10-2003

Aceptado: 13-09-2004

(1) Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA). Apdo. 400. Barquisimeto, Venezuela. E-mail: miguelarizaleta@ucla.edu.ve, jorgepares@ucla.edu.ve.

anthesis was studied in 2003. In addition, it was determined the pollen grains germinability and viability. Anthesis was evaluated by direct observations in field, selecting flowers at random. For the germinability two artificial medium of incubation were used: 1. saccharose solution to 5 %, and 2. 0.2 g/L of H₃BO₃; 1,0 g/L de Ca(NO₃)₂·4H₂O and 50.0 g/L of saccharose. Viability was determined using aniline blue in lactophenol at 1 % as dry. The period from the emergency of the floral button to the anthesis lasted 40.04 ± 2.75 days, and it occurred in five phases. The grain of pollen showed better *in vitro* germination. Pollen germination was higher in the phases IV and V with 90.50 and 81.04 %, respectively. Pollen viability was affected by floral phases. Pollen viability was higher in the phase V (97.75 %), followed of 90.50 % by phase IV.

Key words: anthesis, pollen grains germinability, pollen grains viability, soursop, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

La familia Annonaceae incluye aproximadamente 120 géneros los cuales están distribuidos en las áreas tropicales y subtropicales del mundo. El género *Annona* es el más importante con alrededor de 50 especies. Sus representantes son plantas leñosas de porte arbustivo o arbóreo (Kiill y da Costa 2003).

El guanábano (*Annona muricata* L.), desde el punto de vista comercial es el principal miembro de esta familia. Sus frutos son utilizados tanto para el consumo fresco como para el procesamiento agroindustrial (Nobre *et al.* 2003).

En países como Venezuela, Brasil, Colombia y Costa Rica, entre otros, ha tomado importancia económica por la alta demanda de sus frutos, tanto para el consumo fresco, como para el procesamiento agroindustrial.

Sin embargo, su consumo como fruta fresca es limitado, principalmente por la mala presentación comercial de los frutos, los cuales exhiben formas asimétricas y poseen corta vida postcosecha (Avilán *et al.* 1992, Rebouças *et al.* 2000).

Los procesos de polinización y fecundación de flores de *A. muricata* son limitados por fenómenos particulares. Las estructuras reproductivas presentan el fenómeno de heterostilia (Pinto y Genú 1984). La apertura floral puede prolongarse por más de 130 horas (Escobar *et al.* 1986, Guzmán 1994), existe falta de sincronización en la maduración de los antófilos y son femeninos los primeros que maduran (Pinto y Ramos 1997). A pesar de que tal estrategia de dicogamia protogínica favorece la polinización cruzada, la flor se presenta en preantesis y antesis temprana como una estructura morfológicamente cerrada, lo cual

dificulta la polinización por el viento e insectos (Figuroa 1978, Worrell *et al.* 1994). Todos estos aspectos constituyen un obstáculo para que los granos de polen viables lleguen a los estigmas cuando éstos aún se encuentran receptivos, lo que afecta la calidad de los frutos y el rendimiento de las plantas (Guzmán 1994, Pinto y Ramos 1997).

Escobar *et al.* (1986) señalaron que en Colombia (Valle del Cauca) las yemas florales tardan entre 60 y 82 días para completar su desarrollo, mientras que en la zona de Armero, 97,50 % de las yemas inició su apertura entre 56 y 60 días de edad del botón floral. La apertura floral si bien puede diferir por condiciones de clima u otros factores no determinados presenta una secuencia más o menos definida y sincronizada en varias etapas (Guzmán 1994).

Escobar *et al.* (1986) señalaron que la mayor secreción y receptividad estigmática ocurre entre 72 y 82 horas de iniciada la antesis. Mientras que Guzmán (1994), reportó mayor receptividad del estigma entre 120 y 147 horas de iniciada la apertura floral, diferencias debidas posiblemente en denominación de los estados de apertura floral o en el método de conteo de la horas acumuladas.

Esta particularidad floral determina que *A. muricata*, al igual que otras anonáceas, presenten bajo cuajado de frutos (Lederman y Bezerra 1997, Pinto y Ramos 1997), lo que ha limitado en gran parte la expansión del cultivo. Sin embargo, la polinización artificial es una técnica que se ha utilizado para

solventar esta problemática y actualmente es una práctica agrícola común en países como Brasil, EE.UU, España, Chile, Nueva Zelanda, entre otros. (Rosell *et al.* 1999, Rebouças *et al.* 2000).

El éxito de la polinización manual para incrementar la fijación de los frutos es variable, debido a que la polinización artificial es altamente dependiente de la viabilidad y germinabilidad de los granos de polen (Rosell *et al.* 1999).

En varias especies de plantas se han encontrado diversos métodos para determinar la germinabilidad de los granos de polen tanto “*in vitro*” como “*in vivo*” (Shivanna y Heslop-Harrison 1981). Sin embargo, se han señalado evidentes diferencias relacionadas con los requerimientos de los medios de germinación, debido a las distintas sustancias ofrecidas por la superficie estigmática activa de cada especie en particular (Rosell *et al.* 1999) y al estado en que son liberados los granos de polen (Brewbaker 1957).

Se han realizado estudios para determinar la germinación de los granos de polen de varias especies de *Annona*. Sin embargo, estos ensayos han arrojado resultados poco consistentes, aunque no está claro si ellos fueron originados por un inadecuado comportamiento de los granos de polen debido a la acción de las condiciones climáticas, o a la carencia de un adecuado medio de germinación. (Kumar *et al.* 1977, Rosell *et al.* 1999).

En consideración de la problemática planteada y la escasa información disponible en Venezuela sobre la biología floral del guanábano, se planteó en esta investigación caracterizar el período desde la emergencia del botón floral hasta la antesis, y además, determinar la viabilidad y la germinabilidad “*in vitro*” de los granos de polen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación fue conducida durante el año 2003 en una plantación de guanábano localizada en Tarabana, municipio Palavecino, estado Lara, Venezuela: latitud 10° 1' 25" N, longitud 69° 17' W, 510 msnm. La precipitación promedio alcanza 870 mm/año. La media anual de temperatura es 25,2 °C y la evaporación duplica el valor de la precipitación.

Las plantas evaluadas crecieron libremente hasta alcanzar un metro de altura y posteriormente fueron sometidas a una primera poda de formación. Esta última consistió en el corte del eje principal a una altura de 60 cm del suelo y la eliminación de las ramas, dejando cuatro de éstas ubicadas entre 30 y 60 cm desde el suelo según lo señalado por Sacramento y Vieira (1997). Cuatro meses después se despuntaron las ramas de primer orden.

El tiempo promedio transcurrido desde la emergencia del botón floral a la antesis se determinó marcando un botón floral visible (4 mm de longitud

aproximadamente). Para ello, se seleccionaron al azar 50 flores (cinco por planta). Para la caracterización de las diferentes fases de apertura floral se marcaron igualmente 50 botones florales (cinco por planta) de 30 mm de diámetro aproximadamente, los cuales se observaron *in situ* tres veces al día.

La germinabilidad de los granos de polen *in vitro* se determinó utilizando 10 flores de cada uno de los estados florales descritos en esta investigación. Las flores se colectaron intactas y se llevaron al laboratorio en bolsas de papel perforadas. Allí, se les desprendieron las anteras y éstas se colocaron en una piedra de toque. Para lograr la germinación de los granos de polen fueron usados dos medios artificiales de incubación: 1. solución de sacarosa al 5 % (Rosell *et al.* 1999) y 2. 0,2 g/L de H₃BO₃, 1 g/L de Ca(NO₃)₂·4H₂O y 50 g/L de sacarosa (Da Silva *et al.* 1999).

Las anteras se distribuyeron uniformemente en la solución azucarada, y con unas pinzas se extrajeron los granos de polen. Luego, con una pipeta Pasteur se tomó una alícuota de cada solución y se colocó sobre un porta-objeto el cual estaba dentro de una cápsula de Petri que contenía papel de filtro humedecido. Las cápsulas se mantuvieron a temperatura ambiente (24 ± 2°C). A partir de la primera hora de incubación se comenzaron a realizar observaciones cada media hora hasta que el porcentaje de germinación fuese constante, los granos de polen germinados y no

germinados se observaron y contaron empleando un microscopio óptico (Parés *et al.* 2001).

Los porcentajes de germinación fueron calculados contando aproximadamente 100 granos al azar en un determinado campo óptico, utilizando al menos cinco campos ópticos por muestra. El procedimiento se repitió 10 veces para cada fase floral descrita en esta investigación. Se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado, previa comprobación de los supuestos del análisis de la varianza, en arreglo factorial 5x2 (cinco fases florales y dos medios de incubación), para un total de 10 tratamientos.

Para estimar la viabilidad de los granos de polen por flor se utilizó la metodología señalada por Parés *et al.* (2001). Bajo la lupa estereoscópica y con ayuda de dos agujas de disección se procedió a abrir las anteras sobre una piedra de toque. Luego, se agregó 0,1 ml de azul de anilina en lactofenol al 1%, el cual coloreó los granos de polen viables. Se verificó que todos los granos de polen quedaran libres de las anteras y éstas fueron retiradas del líquido. La mezcla se agitó bien con una aguja, y se transfirió una gota de ésta usando una pipeta Pasteur a una lámina porta-objeto. En cada medición se contaron los granos de polen viables y no viables (no coloreados y deformes) usando el microscopio óptico.

La viabilidad fue determinada contando aproximadamente 100 granos al azar en un campo óptico aumentado

400 veces, utilizando cinco campos por muestra. El procedimiento se repitió 10 veces para cada fase floral descrita en esta investigación. Esta variable por no cumplir los supuestos para el análisis de la varianza fue analizada por vía no paramétrica (Rangos de media de Kruskal-Wallis).


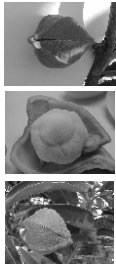
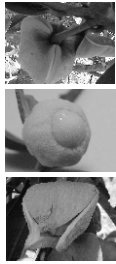


Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa Statistic Analysis System 6.12 (1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El desarrollo floral, incluida la floración, se presentó siguiendo una secuencia definida y sincronizada por cinco fases, y tardó $40,04 \pm 2,75$ días. En la Tabla 1 se describen los cambios más notorios ocurridos durante el proceso.

Según los resultados obtenidos en esta investigación, se pudo observar que los eventos que ocurren en el proceso de apertura floral (desde fase II hasta fase V) son similares a los reportados en Colombia por Escobar *et al.* (1986) y Guzmán (1994). Sin embargo, la sincronización del proceso de apertura floral fue diferente. Puesto que para nuestras condiciones demoró $53,92 \pm 2,80$ horas, mientras que en Colombia tardó entre 95 y 144 horas, respectivamente. Este período probablemente se ve afectado no sólo por el material genético sino también por las condiciones climáticas imperantes en cada región (Guzmán 1994).

Tabla 1. Caracterización de las fases desde el inicio de la formación del botón floral hasta la antesis total de la flor de *Annona muricata* L.

Fases Flores	Características más notorias de cada una de las fases florales	Duración		Fotografía de las fase florales
		Horas	Días	
Fase I	Desde inicio de formación del botón floral hasta la iniciación de la separación de los pétalos externos .En dirección basípeta	906,96 ± 57,36	37,79 ± 2,39	
Fase II	Desde finalización de la fase anterior, hasta la separación de ½ de la totalidad de la unión de los pétalos externos. Anteras muy compactas y de coloración blanco cremoso. Superficie estigmática con poca secreción.	21,73 ± 2,05	0,91 ± 0,09	
Fase III	Desde finalizado el estado anterior hasta la separación total de los pétalos externos y su apertura hasta menos de ½ de su longitud. Anteras compactas y de color blanco cremosos. La superficie estigmática con abundante secreción.	19,54 ± 2,82	0,81 ± 0,12	
Fase IV	Desde final de fase anterior hasta la apertura total de los pétalos externos, tornándose visibles los pétalos internos, los cuales permanecen aún cerrados. Anteras compactas, de color crema. Se inicia secamiento de la secreción estigmática	12,65 ± 3,52	0,53 ± 0,15	
Fase V	Inicio de la caída de los pétalos, hasta su caída total. Anteras de color oscuro, se produce su dehiscencia acompañada por el desprendimiento parcial de los estambres. El área receptiva del estigma se seca en su totalidad.	11,94 ± 3,09	0,50 ± 0,13	

Tanto la germinación como la viabilidad de los granos de polen fueron afectadas por las fases descritas en este trabajo. En las Figuras 1 y 2 se observa la germinación de los granos de polen, al transcurrir el tiempo, de las distintas fases de apertura floral en dos medios artificiales de incubación. En estas figuras, se puede observar que los granos de polen obtenidos en las fases de apertura floral IV y V iniciaron la germinación a pocos minutos de estar en contacto con los medios de incubación evaluados, a diferencia de los granos de polen obtenidos en el resto de las fases de apertura floral. En las cuales, con el medio de incubación 1 los granos de polen iniciaron su germinación a partir de las dos horas y media y cuatro horas y media en las fases III y II, respectivamente. Mientras que en el medio 2 los granos de polen iniciaron su germinación a partir de las dos y cuatro horas en las fases II y I, respectivamente. Independientemente del medio de incubación, los granos de polen de la fase I no germinaron durante el período de evaluación. A partir de las cinco horas de incubación no hubo más formación de tubos polínicos en ninguno de los casos.

La germinación de los granos de polen se afectó por las fases de apertura floral y los medios de incubación, y se detectaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la interacción de los factores evaluados sobre esta variable. Al analizar los resultados (Fig. 3) se encontró que en la medida que avanza la apertura floral se incrementa el porcentaje de germinación de los granos

de polen. Igualmente, la utilización del medio 2 permitió obtener mayor germinación para cada una de las fases en comparación con el medio 1. Sin embargo, los granos de polen de la fase 1 no germinaron independientemente del medio utilizado. Se observa también muy baja germinación de los granos de polen de la fase 2 en los medios 1 y 2 (1,40 y 2,45 %), respectivamente. En cambio en la fase 3 el comportamiento fue diferente al utilizar el medio 2 (29,28 %) en comparación con el medio 1 (3,55 %). Los granos de polen de la fase IV cultivados en el medio 2 presentaron los mayores valores de germinación (90,50 %), seguidos de los granos de polen de la fase V incubados en el mismo medio (81,08 %).

Resultados similares fueron obtenidos por Da Silva *et al.* (1999), quienes mencionaron que el medio nutritivo que proporciona las mejores condiciones para la determinación del porcentaje de germinación *in vitro* de

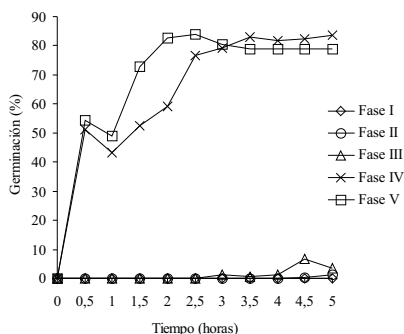


Figura 1. Germinación de los granos de polen de *A. Muricata* en medio artificial compuesto por sacarosa 5 %.

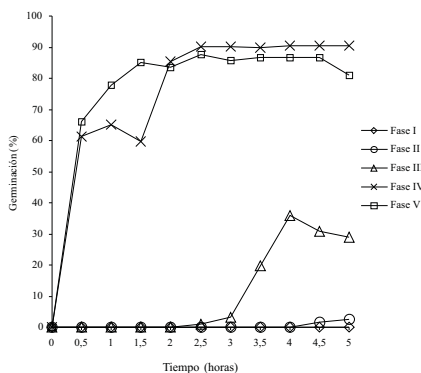


Figura 2. Germinación de los granos de polen *A. Muricata* en medio artificial compuesto por 0,2 g/L de H_3BO_3 ; 1,0 g/L de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ y 50,0 g/L de sacarosa.

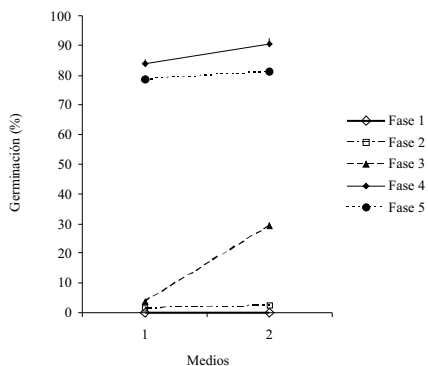


Figura 3. Efecto de las fases de apertura floral y los medios de incubación sobre la germinación *in vitro* de los granos de polen de *A. Muricata* a las 5 horas de incubación.

los granos de polen de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* fue el constituido por 0,2 g/L de H_3BO_3 ; 1,0 g/L de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ y 50 g/L de sacarosa. Adicionalmente, Rosell *et al.* (1999) al evaluar la

germinación *in vitro* de los granos de polen de *A. cherimola* Mill, reportaron que el medio de cultivo, para obtener la mayor germinación, requirió de calcio y boro como también de sacarosa entre 5 y 10 %, la cual juega un papel importante como sustancia nutritiva y osmoreguladora. En este mismo sentido Morales *et al.* (2001), indicaron que los mejores índices de germinación de los granos de polen en *Hevea brasiliensis* ocurrieron cuando la concentración de sacarosa en el medio de incubación era 20% con la presencia de ácido bórico. Por lo tanto, la sacarosa, el boro y el calcio son sustancias necesarias para la germinación *in vitro* de los granos de polen de *A. muricata* así como de otras especies (Knox *et al.* 1986, Affonso y Cruz de Almeida 1997, Morales *et al.* 2001).

El bajo porcentaje de germinación en las fases I, II y III es consecuencia de su estado de inmadurez. A diferencia de los granos de polen colectados en las fases IV y V, en las cuales se obtuvo un alto porcentaje de germinación. Por lo tanto, uno de los factores que puede afectar el éxito de la polinización manual para incrementar el cuajado de frutos en esta especie es el uso de polen fisiológicamente maduro. Al respecto Saavedra (1977), señaló que la falla en el cuajado de frutos de *A. cherimola* Mill después de una polinización artificial es atribuida a posibles estados de inmadurez de los granos de polen, ya que han sido observados sobre la superficie estigmática activa con la forma de

tétradas. Estado en el cual, la germinación de los granos de polen es nula o muy errática (Rosell *et al.* 1999).

La viabilidad de los granos de polen varió en las distintas fases de apertura floral. Por lo tanto, la potencialidad de los granos de polen para germinar es afectada por la fase (Tabla 2). El porcentaje de granos de polen viables por flor fue superior en la fase de apertura floral V (97,75 %), momento en que ocurre la dehiscencia de las anteras. Sin embargo, los grupos formados por las fases IV y III fueron similares estadísticamente al grupo floral V, y las fases de apertura I y II presentaron los menores porcentajes de viabilidad 0,0 y 4,0 %, respectivamente. Escobar *et al.* (1986) mencionaron que la viabilidad de los granos de polen de *Annona muricata* aumenta cuando ocurre la dehiscencia de las anteras.

Tabla 2. Viabilidad de los granos de polen para cada fase de apertura floral en *A. muricata*.

Fases florales	Viabilidad (%)
V	97,75 a
IV	90,50 ab
III	58,00 abc
II	4,00 bc
I	0,0 c

Medias seguidas con la misma letras no difieren estadísticamente según Kruskal-Wallis (5%)

CONCLUSIONES

- ✍ El período desde la emergencia del botón floral hasta la antesis total fue de $40,04 \pm 2,75$ días y presentó una secuencia sincronizada en cinco fases.
- ✍ El medio que proporcionó las mejores condiciones para la germinación in vitro de los granos de polen fue el constituido por 0,2 g/L de H_3BO_3 , 1 g/L de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ y 50,0 g/L de sacarosa. Los granos obtenidos de la fase IV presentaron mayor germinación.
- ✍ La fase de apertura floral afectó la potencialidad de los granos de polen para germinar, pero el porcentaje de granos de polen viables significativamente mayor correspondió a la fase V de apertura floral.

REFERENCIAS

- Affonso, M. e De Almeida, E. 1997. Viabilidade e germinação do polen de linhagens parentais de cebolla híbrida. *Pesq. Agropec. Bras.* 32. (4): 345-349.
- Avilán, L., Leal, F. y Bautista, D. 1992. *Manual de Fruticultura Cultivo y Producción*. Tomo I. Segunda edición. América C. A. Caracas. 309-401 pp.
- Brewbaker, J. 1957. Pollen cytology and self-incompatibility system in plants. *J. Heredity.* 48: 271-277.
- Da Silva, M., Horst, C., Picando, M. e Damiao, C. 1999. Factores que

- afentam a germinação do grão de polen do maracuja: meio de cultura e tipos de agrotóxicos. *Pesq. Agropec. Bras.* 34 (3): 347-352.
- Escobar, W., Zarate, R. y Bastidas, A. 1986. Biología floral y polinización artificial del guanábano, *Annona muricata* L. en condiciones del Valle del Cauca, Colombia. *Acta Agron.* 36(1): 7-20.
- Figueroa, M. 1978. El cultivo de la guanábana. Primer curso internacional sobre fruticultura tropical. Instituto de Investigaciones Agronómicas. CENIAP-FONAIAP. Venezuela. 1-32 pp.
- Guzmán, F. 1994. Polinización artificial del guanábano. *En* Gallego, R (ed) *Frutas Tropicales*. Colombia. 127-134 pp.
- Kiill, L. e Da Costa, L. 2003. Biología floral e sistema de reprodução de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) na região de Petrolina-PE. *Ciencia Rural*. 33 (5): 851-856.
- Knox, R., Willians, E. and Dumas, C. 1986. Pollen, pistil and reproductive function in crop plants. *Plant Breeding Reviews* 4: 9-79.
- Kumar, R., Hoda, M. and Singh, D. 1977. Studies on the floral biology of Custard apple (*Annona squamosa* L.). *Indian J. of Horticulture* 32(3): 252-256.
- Lederman, I e Bezerra, F. 1997. Indução e polinização de anonáceas. *En* Rebouças, A., Boas, I., Magalhães, O. e Hojo, T. eds. *Anónáceas Produção e mercado*. UESB. Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. 142-149 pp.
- Morales, A., De Souza, P. e Godoy, G. 2001. Estudo de germinação do grão de pólen da seringueira. *Científica*. São Paulo. 29(½):131-136.
- Nobre, R., Fernandes, P., Raj, H., De Seixas, F., Becerra, I. e Tavares, M. 2003. Germinação e formação de mudas enxertadas de gravioleira sob estresse salino. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38(12): 1365-1371.
- Parés, J., Basso, C. y Jáuregui, D. 2001. Cantidad, Viabilidad y Germinabilidad de Granos de Polen en Flores de Lechosa (*Carica Papaya* L.) Cv Cartagena Amarilla. *En* X Jornadas de Investigación del Decanato de Agronomía. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Barquisimeto, Venezuela. 127 pp.
- Pinto, A. e Genú, P. 1984. Contribuição ao estudo técnico científico da graviola (*Annona muricata* L.). *En* Congresso Brasileiro de Fruticultura. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Fruticultura/EMPASC. 2: 529-546.
- Pinto, A. e Ramos, V. 1997. Graviola: Formação do pomar e tratamentos culturais. *En* Rebouças, A., Boas, I., Magalhães, O. e Hojo, T. eds. *Anónáceas Produção e mercado*. UESB. Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. pp. 94-104.
- Rebouças, A., Nieto, D., Hojo, T., Bôas, I. e Pereira, M. 2000. Cultivo da graviola. UESB/DFZ. Vitória da Conquista BA. 27 pp.
- Rosell, P., Herrero, M. and Galan, P. 1999. Pollen germination of

chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) In vivo characterization and optimization of in vitro germination. *Scientia Horticulturae* 81: 251-265.

Saavedra, E. 1977. Influence of pollen grain stage at the time of hand pollination as a factor on fruit set of cherimoya. *Hortscience* 12(2):117-118.

Sacramento, C. e Vieira, J. 1997. Formação do pomar e tratamentos culturais da grabiola. *En Reboças*, A., Boas, I., Magalhães, O. e Hojo, T. eds. *Anonáceas Produção e mercado*. UESB. Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. 88-93. Pp.

Shivanna, K. and Heslop-Harrison, J. 1981. Membrane state and pollen viability. *Ann. Bot.* 47:759-770.

Statistic Analysis System 6.12. 1996. SAS user's guide. SAS Inst., INC., Cary, NC. 330 pp.

Worrell, D., Carrington, C. and Huber, D. 1994. Growth, maturation and ripening of soursop (*Annona muricata* L.) fruit. *Scientia Horticulturae* 57:7-15.