

Morfología de la semilla, presencia de aréolas y entrada de agua en la imbibición de *Vicia dasycarpa* Ten. cv. Tolse F.C.A

Seed morphology, presence of areoles and water entry at imbibition of *Vicia dasycarpa* Ten. cv. Tolse F.C.A

Perissé P¹ y GM Tourn²

Resumen. Se estudiaron las características morfológicas de la semilla de *Vicia dasycarpa* Ten. cv. Tolse F.C.A, en relación con la zona donde se inicia la entrada de agua en la imbibición y se observó la presencia de aréolas. Las semillas se analizaron con los microscopios estereoscópico, óptico y de barrido (MEB). La determinación de la zona inicial de agua se realizó sumergiendo las semillas en una solución de tetrazolio (1%). Este estudio mostró que esta especie posee semillas con un halo que enmarca al hilo y un arilo seco inconspicuo y el micrópilo deltoide. El patrón de ornamentación de la cubierta seminal es papiloso. La barra de traqueidas presenta puntuaciones areoladas, ligeramente verrugosas y está rodeada por un anillo de células parenquimáticas. Se comprobó la presencia de un capuchón radicular de origen endospermico que protege a la radícula. Se identificó la presencia de 2 dos pares de aréolas cotiledonares. Se estableció que la entrada de agua durante la imbibición se inicia en la zona de la lente -que presenta grietas- y avanza en el plano sagital. Las características citológicas de la barra de traqueidas y la presencia de aréolas muestran un estado apomórfico entre las Papilionoideas.

Palabras clave: *Vicia dasycarpa*; Cubierta seminal; Embrión; Aréolas; Grietas.

Abstract. The morphological characteristics of the seeds of *Vicia dasycarpa* Ten. cv. Tolse FCA were studied in relation to the area of imbibition water entry and were considered the presence of areoles. Seeds were analyzed using a stereo, optical and scanning electron microscope (SEM). The determination of the initial water entry area was carried out by immersing the seeds in a solution of tetrazolium (1%). This study showed that this species has seeds with a halo framing the hilum, an inconspicuous dry aril and a deltoide micropyle. The seedcoat pattern is papillose. The tracheid bar is surrounded by a ring of parenchymatous cells, and the tracheids show slight warty and non-vestured pits. It was confirmed the presence of an endospermic radicle pocket that surrounds and protect the radical tip. Two pairs of cotyledonar areoles were identified. It was established that the entry of water during imbibition starts in the area of the lens -having cracks- and moves in the sagittal plane. Both citological characteristic of tracheid bar and areoles presence show an apomorphic state between the Papilionoids.

Keywords: *Vicia dasycarpa*; Seed coat; Embryo; Areoles; Cracks.

¹ Departamento Fundamentación Biológica, Botánica Morfológica. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Ing. Agr. Félix Aldo Marrone 746, Ciudad Universitaria, C.C. 509, 5000, Córdoba, Argentina.

² Cátedra de Botánica. Laboratorio Estación de Biología Sierras, FAUBA.
Address Correspondence to: Patricia Perissé, e-mail: pperisse@agro.unc.edu.ar
Recibido / Received 12.VI.2014. Aceptado / Accepted 23.VII.2014.

INTRODUCCIÓN

Es ampliamente reconocido que el conocimiento de la semilla, la identificación y la ubicación relativa de sus componentes son fundamentales para cualquier estudio sobre la germinación (Jacobsen, 1984). Diversos autores (Corner, 1976; Gunn, 1981; Lersten, 1981, 1982; Lersten y Gunn, 1982; Boeswinkel y Bouman, 1984; Manning y Van Staden, 1987; McDonald et al., 1988; Kaur y Pal, 1989; Van Dongen et al., 2003; Meyer et al., 2007, entre otros) han estudiado la morfología de las semillas de leguminosas, en un principio con un enfoque filogenético y sistemático, y posteriormente tratando de establecer relaciones entre las diferentes estructuras y sus funciones. En las Papilionoideas, se ha prestado atención en la presencia de las denominadas “aréolas” *sensu* Endo y Ohashi, (1998) y Lackey (2007) y que anteriormente fueran citadas para diversas especies de *Glycine*, como “pit” y “anti pit” *sensu* Yalick et al. (1989, 1996). Estas estructuras, definidas por sus características celulares propias, se encuentran en la cara abaxial de los cotiledones, el “pit”, al que se le contrapone el “anti-pit” en la cara interna cóncava del endosperma unido a la cubierta seminal. Asimismo, la posición, forma y características de estas estructuras son datos de interés taxonómico (Endo y Ohashi, 1998; Lackey, 2007).

La disponibilidad de agua para la rehidratación de la semilla es un requisito indispensable para iniciar la germinación (Koller, 1972); la fuerza directriz del movimiento de agua hacia la semilla depende del gradiente de potencial agua entre la semilla y el suelo (Bewley y Black, 1994). En relación al ingreso de agua, están indicadas diversas regiones de la semilla como lugares iniciales de dicha entrada. En soja (*Glycine max*) se estableció que la principal zona de ingreso es la opuesta al hilo, donde se identificaron pliegues de la cubierta seminal (Casini, 1990; Ma et al., 2004; Meyer et al., 2007); por otro lado, en *Lupinus albus* y *L. angustifolius* el ingreso del agua se inició en la lente, donde se detectaron poros (Perissé y Planchuelo, 2004).

Los estudios de la ornamentación de la cubierta seminal realizados en *Vicia*, mediante microscopía óptica y electrónica de barrido (MEB), mostraron que existe un consenso entre los autores respecto al patrón papiloso de la misma (Lersten y Gunn, 1982; Manning y Van Staden, 1987; Kaur y Pal, 1989; Chernoff et al., 1992; Marin et al., 1998; Kirkbride et al., 2003).

Perrino et al. (1984) propusieron una clave en base a características seminales como forma, tamaño, hilo, lente, etc., para identificar distintas especies de *Vicia*.

El cultivar *Vicia dasycarpa* Ten. cv. Tolse F.C.A, inscripto en el “Registro Nacional de la Propiedad de Cultivares” se destaca por una alta producción de materia seca durante el período invernal y la tolerancia a condiciones de escasas precipitaciones, bajas temperaturas, plagas y enfermedades (Coraglio et al., 2001). Es así, que este cultivar se presenta como

una alternativa para ofrecer forraje de calidad en ambientes desfavorables; sin embargo, es escasa la información respecto a la morfología de su semilla. Es importante señalar que a partir de la constante actualización de los nombres científicos, *V. dasycarpa* (Ten.) es reconocida como sinónimo de *V. villosa* Roth subsp. *varia* (Host) Corb. (ISTA, 2007).

En base a los antecedentes los objetivos del trabajo fueron: caracterizar la morfología de la semilla de *Vicia dasycarpa* Ten. cv. Tolse F.C.A, investigar la presencia de aréolas y determinar la zona inicial de entrada del agua durante la imbibición y su relación con las características seminales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Los estudios se realizaron con semillas de líneas mejoradas de *Vicia dasycarpa* Ten. cv. Tolse F.C.A, provenientes de los cultivos realizados en parcelas de la FCA-UNC durante el ciclo 2009. Se utilizaron semillas de frutos cosechados y trillados en forma manual, y almacenados a temperatura ambiente, en bolsas de papel hasta el momento de realización de los ensayos. El Herbario (ACOR) y la colección de semillas de la FCA guardan ejemplares representativos (N°578 AMP) como respaldo de estas investigaciones.

Caracterización morfológica de la semilla. Para la caracterización morfológica de la semilla se tuvo en cuenta la clasificación de Martin (1946) y Kirkbride et al. (2003). La determinación del color de la cubierta seminal se realizó mediante las cartas de colores de suelo de Munsell (2000). Las características morfológicas se estudiaron realizando cortes en distintos planos de la semilla analizados con microscopio estereoscópico, óptico y electrónico de barrido (MEB). El patrón de ornamentación de la cubierta seminal se estableció mediante la observación de diafanizados de la cubierta, con microscopio óptico y de barrido y se siguió la terminología propuesta por Lersten (1981) y Werker (1997). El diafanizado de la cubierta seminal, la preparación de los tacos para MEB y la determinación de las sustancias de reservas se realizaron según técnicas de D’Ambrogio de Argüeso (1986). La identificación de aréolas se llevó a cabo sumergiendo las semillas en solución al 1% de cloruro de 2, 3, 5 trifenil tetrazolio (TZ) durante 24 horas a temperatura ambiente, se retiró la cubierta seminal y se observó bajo microscopio estereoscópico y MEB.

Zona inicial de entrada de agua. Se sumergieron las semillas en una solución al 1% de cloruro de 2, 3, 5 trifenil tetrazolio (TZ) a 20 °C, en oscuridad. A medida que las semillas manifestaban los primeros signos de imbibición, fueron removidas de la solución. Luego, se secaron entre toallas de papel a fin de absorber cualquier exceso superficial de la solución y se expusieron a una fuente luminosa, con la finalidad de activar el proceso de reducción del tetrazolio a formazán (compuesto insoluble de coloración roja) (Casini, 1990; Perissé y

Planchuelo, 2004). Las zonas de la cubierta seminal marcadas como puntos iniciales de entrada de agua se observaron con microscopio electrónico de barrido (MEB).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características morfológicas de las semillas. Las semillas de *V. dasycarpa* Ten. cv. Tolse F.C.A se observaron de contorno circular de 3-4 x 3,5 mm con la cubierta seminal de coloración marrón rojiza oscura (5YR, valor 2,5) y vetas negras (Fig. 1A). Las semillas presentaron el hilo lineal (3:1) en posición lateral enmarcado por un halo o corona, el surco hilar divide en su totalidad al hilo y se observaron escasos restos de funículo de coloración blanquecina que forman un arilo inconspicuo. El micrópilo de forma deltoide, se encuentra adnato al hilo en el extremo del lóbulo radicular (Fig. 1B); la lente discolor (negra), se observó sobre elevada en la línea del rafe, distante 0,8 mm del extremo del hilo (Fig. 1C). La semilla mostró las características típicas de una semilla exendospermada aunque se determinó la presencia de una delgada capa de endosperma adnata al tegumento. Dicha capa forma un capuchón que protege la radícula (Fig. 1D). El embrión se clasificó por su posición como tipo axial subtipo curvo, el eje hipocótilo-radicular

se observó perpendicular al eje mayor de la semilla; la radícula, de forma triangular y la plúmula moderadamente desarrollada, glabra; los cotiledones, similares en largo; el nudo cotiledonar y el hipocótilo quedan expuestos, y la radícula permanece revestida por el capuchón radicular (Fig. 1C).

La cubierta seminal presentó un patrón de ornamentación papiloso (Fig. 2A y B), determinado por la protrusión del extremo de un grupo de 10-12 macrosclereidas y por la capa cuticular depositada sobre la pared tangencial externa, definiendo a cada papila con extremo redondeado y flancos surcados (Fig. 2C y D).

Se identificaron un par de aréolas cotiledonares (pit) de contorno oval en la base de los mismos (Fig. 3A-C), y su contraparte en el endosperma adnato a la cara interna de la cubierta seminal (Fig. 3D); además, se observó un segundo par de aréolas distantes 1mm de las anteriores en la cara abaxial de los cotiledones (Fig. 3A). Las células de las aréolas principales se caracterizaron por la convexidad de su pared tangencial externa otorgando una apariencia granular de la superficie de la aréola (Fig. 3C).

Los estudios anatómicos de cortes transversales de la cubierta seminal mostraron los siguientes estratos: la epidermis, compuesta por macrosclereidas (células de Malpighi o empalizada) dispuestas en forma compacta; luego, la hipodermis, formada por osteoesclereidas (células reloj de arena o lagenoesclereidas) con grandes espacios intercelulares; final-

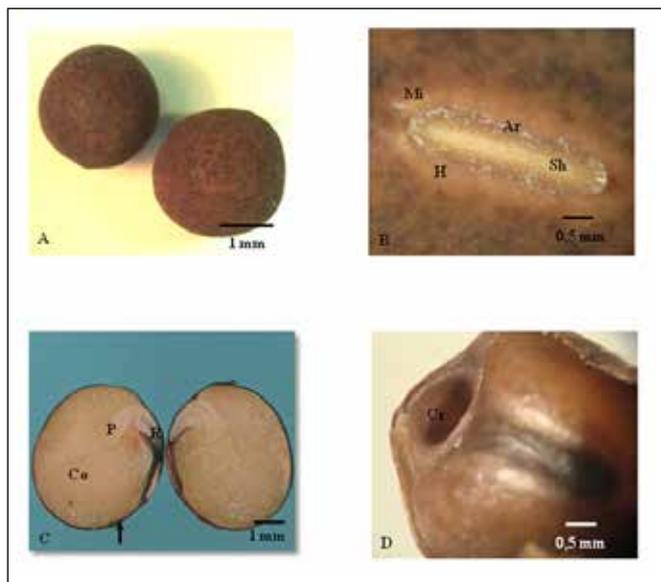


Fig. 1. Características morfológicas de la semilla de *Vicia dasycarpa*. A, vista externa; B, detalle del hilo; C, corte sagital de la semilla; D, detalle del capuchón radicular. Ar, arilo; flecha, lente; Co, cotiledón; Cr, capuchón radicular; En, endosperma; H, halo o corona, Mi, micrópilo; P, plúmula; R, radícula; Sh, surco hilar.

Fig. 1. Morphological seed characteristics of *Vicia dasycarpa*. A, external view; B, hilum detail; C, sagittal seed section; D, radicle cap or "pocket" detail. Ar, aril; arrow, lens; Co, cotyledon; Cr, radicle cap; En, endosperm; H, halo or corona, Mi, micropyle; P, plumule; R, radicle; Sh, hilar groove.

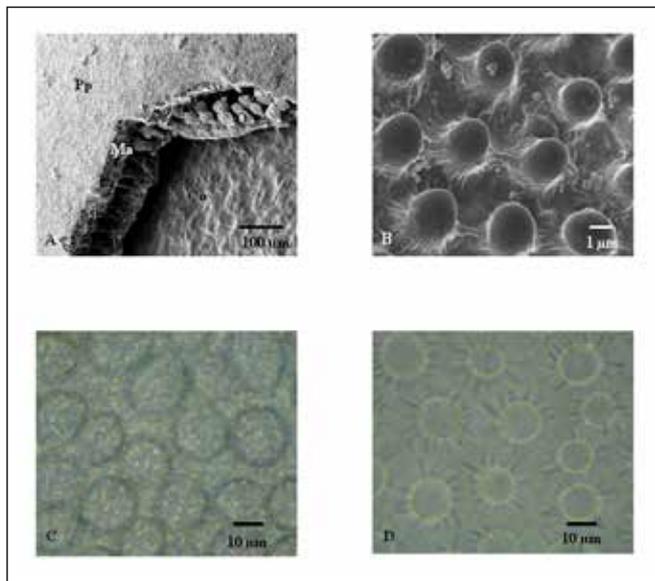


Fig. 2. Patrón de ornamentación de la cubierta seminal de *Vicia dasycarpa*. A, fractura de la cubierta seminal; B, patrón de ornamentación papiloso MEB; C y D, diafanizado de la cubierta seminal. Co, cotiledón; Ma, macrosclereidas; Pp, patrón papiloso.

Fig. 2. Seed coat pattern of *Vicia dasycarpa*. A, seed coat fracture; B, papilose seed coat pattern SEM; C and D, clarified seed coat. Co, cotyledon; Ma, macrosclereids; Pp, papilose pattern.

mente, varios estratos de células parenquimáticas comprimidas, con paredes engrosadas, que corresponden a restos del endosperma (Fig. 4A). El corte transversal por la región media del hilo reveló las macrosclereidas en empalizada y la contraempalizada que delimitan el surco hilar; inmediatamente por debajo se encontró la barra de traqueidas blanquecina, de forma ovoide rodeada por 2 capas de células parenquimáticas de paredes delgadas e incluida en un parénquima estrellado de paredes celulares significativamente engrosadas (Fig. 4B y C). Se observaron claramente las paredes terminales de las traqueidas, los pares de puntuaciones areoladas; algunas ligeramente verrugosas, en su mayoría sin restos de membrana (pared primaria) (Fig. 4D y E). Al mismo tiempo en la lente, se observó el gradual acortamiento de las osteoesclereidas (Fig. 4F).

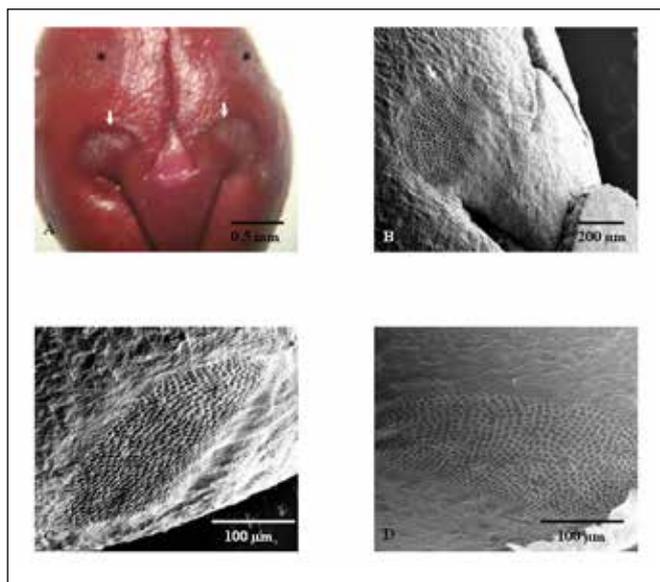


Fig. 3. Aréolas en *Vicia dasycarpa*. A-B, ubicación de las aréolas en el embrión; C, detalle de la aréola cotiledonar principal (pit); D, complemento de la aréola en el endosperma (antipit). Flechas, aréolas principales; asterisco, segundo par de aréolas.

Fig. 3. Areoles in *Vicia dasycarpa*. A-B, areoles position in the embryo; C, detail of the principal cotyledon areole (pit); D, areole complement in the endosperm (antipit). arrows, principal areoles; asterisk, second pair of areoles.

Las sustancias de reserva encontradas fueron proteínas en las capas de células parenquimáticas del endosperma y lípidos en los cotiledones. El peso promedio de mil semillas fue de $39,8 \pm 0,2$ g. El contenido de humedad fue de 9,6%.

Las características exomorfológicas de las semillas concordaron en general con las señaladas por Perrino et al. (1984) y Kirkbride et al. (2003), para *Vicia*. Sin embargo, según Marin et al. (1998), *V. dasycarpa* presenta semillas (2,2-3,5 mm) y diámetro de papilas (1,5-3 μ m) más pequeñas en comparación con *V. villosa* (3-4 mm y 2-3 μ m, respectivamente). No obs-

tante, se determinó que la cubierta seminal es marrón rojiza con vetas negras. Además, se cita por primera vez la presencia del endosperma que forma un capuchón radicular. Las funciones de este capuchón pueden estar relacionadas con (1) la orientación del embrión durante el desarrollo de la semilla, (2) la protección mecánica del meristema apical radical (MAR), (3) el mantenimiento de la hidratación del mismo durante la imbibición, y (4) la dirección de la elongación de la radícula en la germinación; estas sugerencias concuerdan con las propuestas efectuadas por McDonald et al. (1988) en soja. La característica de embrión curvo coincide con lo señalado por

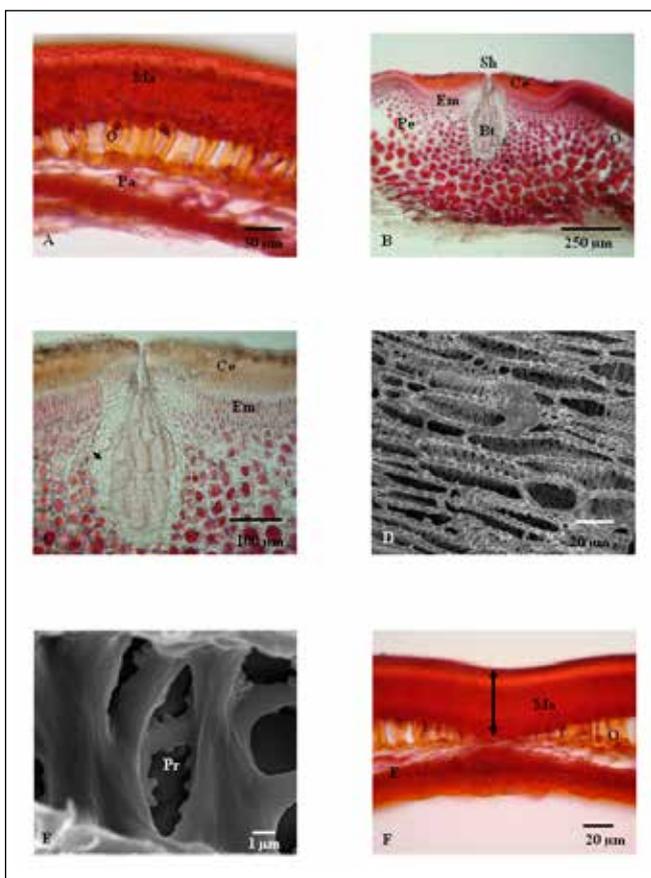


Fig. 4. Distribución de tejidos de la cubierta seminal de *Vicia dasycarpa*. A, corte transversal de la cubierta seminal; B, corte transversal del hilo; C, detalle de la barra de traqueidas (Bt); D, detalle de traqueidas; E, puntuaciones areoladas verrugosas; F, corte transversal de la lente. Bt, barra de traqueidas; E, endosperma; Ma, macrosclereidas; O, osteoesclereidas, Pe, parénquima estrellado; Pa, parénquima; Pr, puntuación areolada verrugosa; Sh, surco hilar; flecha, anillo parenquimático.

Fig. 4. Seed coat tissues distribution of *Vicia dasycarpa*. A, seed coat cross section; B, hilum cross section; C, tracheid bar detail (Bt); D, tracheids detail; E, areolate warty pits; F, lens cross section. Bt, tracheid bar; E, endosperm; Ma, macrosclereids; O, osteosclereids; Pe, stellate parenchyma; Pa, parenchyma; Pr, areolate warty pit; Sh, hilar groove; arrow, parenchyma ring.

Martin (1946) para varias especies de *Vicia*, aún cuando según este autor, éstas carecen de endosperma. Al mismo tiempo, se aportan características complementarias del eje embrionario y su posición respecto a los cotiledones, y por primera vez se determina la presencia y características de 2 pares de aréolas en esta especie. Por otro lado, según Werker (1997), este tipo de embrión, por ser de mayor tamaño que la propia semilla, puede representar una ventaja adaptativa para la supervivencia de la especie, explicando el éxito en el establecimiento de la plántula. La anatomía de la cubierta seminal fue consistente con la distribución de los estratos celulares típica de las leguminosas papilionoideas tal como lo han descrito Kaur y Pal (1989) y Marin et al. (1998). Asimismo, y en concordancia con Lersten (1981) y Manning y Van Staden (1987), el patrón papiloso estuvo determinado por la protrusión del extremo de las macroesclereidas; sin embargo, en este trabajo cada papila se correspondió con un grupo de macroesclereidas cubierta por la cutícula a diferencia de lo señalado por Lersten (1981).

En relación a la anatomía de la región hilar, los resultados fueron consistentes con los de Lersten (1982) y Lersten y Gunn (1982) en términos generales. Sin embargo, las puntuaciones de las traqueidas fueron areoladas ligeramente verrugosas, contrariamente a lo informado por estos autores, quienes afirman que las Viciae están desprovistas de "cualquier verrugosidad". Por otro lado, estudios realizados en aréolas presentes en diversas especies de papilionoideas (Yalick et al., 1996; Endo y Oashi, 1998; Lackey, 2007) sugieren que el íntimo contacto entre las células de ambas superficies opuestas, encastran en forma complementaria, las mantienen conectadas y permiten una alineación entre la cubierta seminal, endosperma y embrión. De esta manera se explica (1) la función de transferencia de las células endospermicas, caracterizadas por las invaginaciones de la pared celular, durante el llenado de la semilla y también durante la imbibición (Yalick et al., 1996; Van Dongen et al., 2003), y (2) que las paredes radiales en las células del endosperma son conspicuas.

Zona inicial de entrada de agua. La región por donde comienza el ingreso de agua quedó evidenciada por la reacción del tetrazolio y la luz, que produce una coloración roja en dicha región de la semilla (en el embrión) durante la imbibición. Se pudo apreciar que la zona que primero se colorea es la lente (estado 1) y luego la zona inmediata posterior a ésta (estado 2). El frente de mojado avanzó en forma periclinal en el plano sagital (Fig. 5A-B). Las evidencias experimentales demostraron que en *V. dasycarpa* existió un movimiento de agua desde la lente y zona posterior a la misma hacia los laterales y el extremo del lóbulo radicular.

En *V. dasycarpa*, a diferencia de lo señalado para lupino (Le Deunff et al., 1989) y soja (McDonald et al., 1988; Ma et al., 2004 y Meyer et al., 2007), no se formaron pliegues en la parte dorsal (antirafe) de la cubierta seminal. La ausencia de pliegues en esta especie se podría deber al espesor relativamente uniforme de la cubierta seminal en las regiones extra

hilares, en las cuales no se generan tensiones, produciéndose una hidratación pareja que evitó el plegado.

Si bien en la región de la lente no se observaron osteoesclereidas o fueron muy cortas, la lente observada al MEB reveló la presencia de grietas (Fig. 5C-D); esto demuestra que éstas son la vía de ingreso de agua en la semilla. Además, estos resultados son consistentes con lo señalado por de Maning y Van Staden (1987) respecto a la función de la lente, y Perissé y Planchuelo (2004) y Ma et al. (2004) respecto a la presencia de poros en la cubierta seminal de lupinos y soja, respectivamente. Las grandes columnas de osteoesclereidas junto con el parénquima -que acompañan a la barra de traqueidas-, facilitan el movimiento del vapor de agua via apoplástica hacia el exterior, durante la deshidratación, y la circulación del agua durante la imbibición hacia el MAR (meristema apical radical) y los cotiledones.

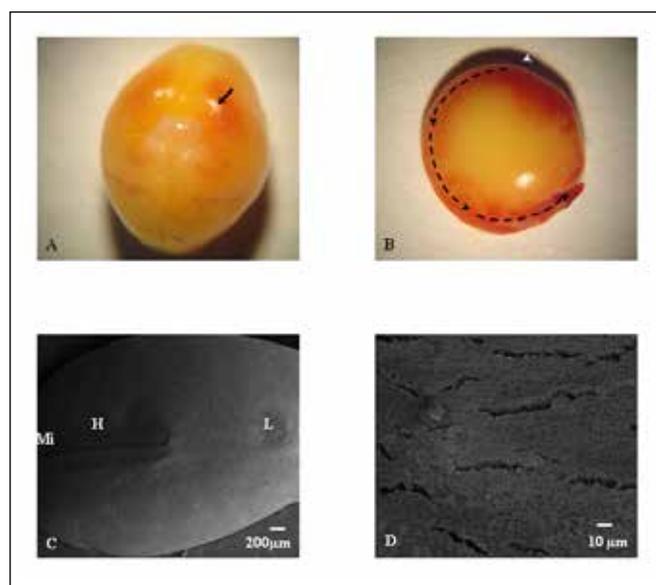


Fig. 5. Zona inicial de entrada de agua, frente de mojado y grietas en la lente. A, coloración en la zona en contacto con la lente; B, avance del frente de mojado en línea de puntos; C, vista del hilo y la lente; D, detalle de grietas en la lente. Flecha, zona de la lente; L, lente.

Fig. 5. Initial water entry area, wetting in progress and lens cracks. A, coloration in the lens contact zone; B, advancing wetting front dotted line; C, hilar and lens view; D, detail of the cracks in the lens. Arrow, lens zone; L, lens.

CONCLUSIONES

Las características morfológicas seminales como (1) el patrón de ornamentación papiloso, (2) las particularidades de la región hilar, (3) la presencia de un capuchón radicular de origen endospermico, y (4) la presencia de las aréolas determinadas en este trabajo aportan caracteres significativos que permiten la identificación de este cultivar, y complementan la clave propuesta por Perrino et al. (1984). Además, las puntuaciones areoladas,

ligeramente verrugosas de la barra de traqueidas, junto con la presencia de aréolas constituyen rasgos apomórficos entre las Papilionoideas. Los resultados experimentales permiten afirmar que la entrada inicial de agua en la imbibición se produce por las grietas que presenta la lente.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración de la Técnica Gabriela Zarlavsky del Laboratorio de Anatomía Vegetal de la Cátedra de Botánica, FAUBA, la Ing. Agr. María Laura Molinelli, FCA, UNC y del personal del Laboratorio de Microscopía Electrónica Lamarx de la UNC, Asimismo se agradece a la Dra. Beatriz Galati por la lectura crítica del presente manuscrito.

El presente trabajo contó con la financiación de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

REFERENCIAS

- Bewley, J.D. y M. Black (1994). Seeds. Physiology of Development and Germination. 2nd Ed. Plenum Press. New York. 445 p.
- Boeswinkel, F.D. y F. Bouman (1984). The seed structure. En: Johri, B.M. (ed), pp. 567-610. Embriology of Angiosperms. Springer Verlag, Berlin.
- Bradford, K. (1995). Water relations in seed germination. En: Kigel J. y Galili G. (eds), pp.351-396. Seed development and germination. Marcel Dekker Inc, New York. 853 p.
- Casini, C. (1990). Seed Imbibitional Studies Related to Seedcoat and Seed Size in Soybean *Glycine max* (L.) Merrill. Genotypes With Different Levels of Permeability. Tesis Ph. D. Mississippi State University. Mississippi State. USA, 160 p.
- Chernoff, M., U. Plitman y M.E. Kislev (1992). Seed Characters and testa texture in species of the Viceae: their taxonomic significance. *Israel Journal of Botany* 41: 167-186.
- Coraglio, J.C., C.A. Vieyra y E.F. Nienstedt (2001). Obtención del cultivar "Tolse F.C.A." de *Vicia dasycarpa* Ten. *Agriscientia* XVIII: 59-62.
- Corner, E.J. (1976). The Seeds of Dicotyledons, Vols. I yII, Cambridge. University Press, Cambridge.
- D'Ambrogio de Argüeso, A. (1986). Manual de Técnicas en Histología Vegetal. 5 Ed. Hemisferio Sur, Bs. As. Argentina. 83p.
- Endo, Y. y H. Ohashi (1998). The features of cotyledon areoles in Leguminosae and their systematic utility. *American Journal of Botany* 85: 753-759.
- Gunn, C.R. (1981). Seeds of Leguminosae. En: Polhill R.M. y Raven E.H. (eds.), pp. 913-925. Advances in Legume systematic. Part 2. Royal Botanical Garden. Kew.
- ISTA, (2007). List of stabilized plant names 5th edition. http://www.seedtest.org/upload/prj/product/ISTA_list_of_stabilized_Plant_Names_Ed_5.pdf.
- Jacobsen, J.V. (1984). The Seed: Germination. En: Johri, B.M. (ed), pp. 611-646. Embryology of Angiosperms. Springer-Verlag New York.
- Kaur, H. y A. Pal (1989). Structure, Anatomy and spermoderm pattern of seeds in some *Vicia* species (Papilionoideae). *Phytomorphology* 39: 363-370.
- Kirkbride, J.H. Jr., C.R. Gunn y A.L. Weitzman (2003). Fruits and seeds of genera in the subfamily Faboideae (Fabaceae). Technical Bulletin n°1890. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. Washington DC. 1.212 p.
- Koller, D. (1972). Environmental control of seed germination. En: Kozlowski, T.T. (ed), pp. 2-101. Seed Biology. Vol II. Academic Press. U.S.A.
- Kupicha, F.K. (1976). The infrageneric structure of *Vicia*. *Notes Royal Botanic Garden Edinburgh* 34: 287-326.
- Lackey, J.A. (2007). Cotyledon areoles in the Fabaceae subtribe clitoriinae. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas* 1: 1101-1118.
- Lersten, N.R. (1981). Testa topography in Leguminosae, subfamily Papilionoideae. *The Proceedings of the Iowa Academy of Science* 88: 180-191.
- Lersten, N.R. (1982). Tracheid Bar and Vestured Pits in Legume Seeds (Leguminosae: Papilionoideae). *The American Journal of Botany* 69: 98-107.
- Lersten, N.R. y Ch. R. Gunn (1982). Testa characters in Tribe Viciae, with notes about tribes, Abreae, Cicereae, and trifolieae (Fabaceae). U.S. Department of Agriculture, Technical Bulletin N°1667. 40 p.
- Ma, F., E. Cholewa, M. Tasneem, C.A. Peterson y M. Gijze (2004). Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coats correlate with their permeability to water. *Annals of Botany* 94: 213-228.
- McDonald, M.B. Jr., C.W. Vertucci y E.E. Ross (1988). Seed coat regulation of soybean seed imbibition. *Crop Science* 28: 993-997.
- Manning, J.C. y J. Van Staden (1987). The systematic significance of testa anatomy in the Leguminosae—an illustrated survey. *South African Journal of Botany* 53: 210-230.
- Marin, P.D., P. Boza, L.J. Merkuikov, B. Krstić, B. Petković y M. Veljić (1998). Seed sculpturing of selected European *Vicia* L. species (Fabaceae) and their taxonomical evaluation. *Seed Science and Technology* 26: 17-32.
- Martin, A.C. (1946). The comparative internal morphology of seeds. *The American Midland Naturalist* 36: 513-660.
- Meyer, C.J., E. Stuedle, C.A. Peterson (2007). Patterns and Kinetics of water uptake by soybean seeds. *Journal of Experimental Botany* 58: 717-732.
- Munsell® soil color charts. (2000). Revised washable edition Ed. Gretagmacbeth. New Winsor, US, pp.55.
- Perissé, P. y A.M. Planchuelo (2004). Seed coat morphology of *Lupinus albus* L. and *L. angustifolius* L. in relation to water uptake. *Seed Science and Technology* 32: 69-77.
- Perrino, P., M. Yarwood, P. Hanelt y G.B. Polignano (1984). Variation of seed characters in selected *Vicia* species. *Kulturpflanze* 32: 103-122.
- Van Dongen, J.T., A.M.H. Ammerlaan, M. Wouterlood, A.C. Van Aelst y A.C. Borstlap (2003). Structure of the developing pea seed coat and the post-phloem transport pathway of nutrients. *Annals of Botany* 91: 729-737.
- Werker, E. (1997). Seed Anatomy. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart, 424 p.
- Yaklic, R.W., E.L. Vigil y W.P. Wergin (1989). The pit and antipit in the genus *Glycine*. *Crop Science* 29: 1304-1309.
- Yaklic, R.W., W.P. Wergin, y E.F. Erbe (1996). Observation of unique structures between the endosperm and embryo seeds of *Glycine max*. *Seed Science Research* 6: 183-189.
- Yaseen, M., S.H. Barringer, W.E. Splittstoessner y S. Costanza (1994). The Role of Seed Coats in Seed Viability. *Botanical Review* 60: 426-439.