



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

**TESIS DOCTORAL**

**BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL AGUACATE  
(*Persea americana* Mill.). IMPLICACIONES PARA LA  
OPTIMIZACIÓN DEL CUAJADO**

**M<sup>a</sup> Librada Alcaraz Arco**

**Málaga, Mayo de 2009**



**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**  
**ESTACIÓN EXPERIMENTAL "LA MAYORA"**  
29750 ALGARROBO-COSTA (MÁLAGA)  
ESPAÑA

D. José Ignacio Hormaza Urroz, Profesor de investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en la Estación Experimental "La Mayora"

CERTIFICA

Que la Memoria titulada "Biología Reproductiva en aguacate (*Persea americana* Mill.). Implicaciones para la optimización del cuajado." que presenta la Licenciada M<sup>a</sup> Librada Alcaraz Arco para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo mi dirección.

Málaga, Mayo de 2009

Fdo. José Ignacio Hormaza Urroz

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos MEC AGL2004-02290/AGR, MEC AGL2007-60130/AGR y P08-AGR-3694 de la Junta de Andalucía.

M<sup>a</sup> Librada Alcaraz Arco ha disfrutado de una Beca predoctoral I3P del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

<b>RESUMEN</b> .....	<b>i</b>
----------------------	----------

<b>SUMMARY</b> .....	<b>iii</b>
----------------------	------------

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

<b>EL AGUACATE</b> ( <i>Persea americana</i> Mill.).....	<b>1</b>
Taxonomía y origen.....	1
Características botánicas .....	3
Situación actual del cultivo .....	4
El cultivo del aguacate en el mundo.....	4
El cultivo del aguacate en España .....	5
Exigencias de cultivo.....	6
<b>PROBLEMÁTICA DEL CULTIVO</b> .....	<b>6</b>
Producción alternante .....	7
Plantación de cultivares complementarios para incrementar la producción .....	7
Plagas y enfermedades del aguacate.....	9
<b>BIOLOGÍA REPRODUCTIVA</b> .....	<b>11</b>
Biología floral del aguacate .....	11
Polinización .....	13
Fase progámica.....	15
El estigma .....	16
Crecimiento del tubo polínico a través del estilo .....	17
Llegada al ovario .....	20
Maduración de las estructuras del pistilo .....	22
Abscisión de flores y frutos .....	23
<b>EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA FASE REPRODUCTIVA</b> .....	<b>25</b>
Efecto sobre el ciclo floral en aguacate .....	25
Efecto sobre el gametofito masculino .....	26
Efecto sobre el gametofito femenino.....	27
Efecto sobre la fecundación y el cuajado .....	28
<b>RESERVAS NUTRITIVAS</b> .....	<b>28</b>

<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
------------------------	-----------

## PARTE I: FASE PROGÁMICA

### 1. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA GERMINACIÓN *IN VITRO* DE POLEN DE AGUACATE

INTRODUCCIÓN.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
Optimización del medio de germinación <i>in vitro</i> .....	35
Material vegetal .....	35
Ensayo de germinación.....	35
Efecto de la temperatura sobre la germinación y el crecimiento del tubo polínico <i>in vitro</i> .....	37
Material vegetal .....	37
Germinación de polen <i>in vitro</i> .....	38
Longitud de los tubos polínicos <i>in vitro</i> .....	39
Análisis estadístico .....	39
RESULTADOS .....	40
Optimización del medio de germinación del polen <i>in vitro</i> .....	40
Germinación de polen con sacarosa y PEG.....	40
Efecto del calcio .....	41
Efecto de la temperatura en la germinación <i>in vitro</i> .....	43
Germinación de polen <i>in vitro</i> .....	43
Longitud del tubo polínico <i>in vitro</i> .....	45
DISCUSIÓN.....	46
Optimización del medio del medio de germinación <i>in vitro</i> .....	47
Efecto de la temperatura sobre el comportamiento <i>in vitro</i> de los granos de polen... ..	48
Efecto de la temperatura sobre la germinación <i>in vitro</i> .....	48
Longitud del tubo polínico <i>in vitro</i> .....	50

### 2. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y DE LA HUMEDAD RELATIVA SOBRE LA FASE PROGÁMICA

INTRODUCCIÓN.....	53
MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
Material vegetal .....	55
Efecto de la temperatura y la humedad relativa sobre la receptividad estigmática	56
Caracterización de las flores.....	56
Polinización .....	56
Preparación del material para el microscopio.....	57
Evaluación de la receptividad estigmática.....	58
Efecto de la temperatura sobre el crecimiento del tubo polínico <i>in vivo</i> .....	58
Material vegetal .....	58
Preparación del material para el microscopio .....	59
Viabilidad del óvulo .....	60
Análisis estadístico .....	60

RESULTADOS .....	60
Efecto de la temperatura en la receptividad estigmática .....	62
Adhesión del polen .....	62
Porcentaje de germinación.....	63
Efecto de la humedad relativa en la receptividad estigmática.....	65
Adhesión de polen .....	65
Germinación de polen.....	66
Efecto de la temperatura en el crecimiento del tubo polínico <i>in vivo</i> .....	67
Efecto de la temperatura sobre la viabilidad del óvulo .....	68
DISCUSIÓN.....	69
Receptividad estigmática.....	69
Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre la adhesión del polen.....	69
Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre la germinación del polen ...	70
Efecto de la temperatura sobre el crecimiento del tubo polínico .....	72
Viabilidad del óvulo .....	74
Conclusión.....	74

## PARTE II: CONSECUENCIAS EN EL CUAJADO

### 3. PATRÓN DE CRECIMIENTO Y CAÍDA DE FLORES Y FRUTOS

INTRODUCCIÓN.....	75
MATERIALES Y MÉTODOS.....	76
Material vegetal .....	76
Cálculo de la tasa de cuajado en flores dejadas a libre polinización.....	77
Polinizaciones manuales.....	78
Control del crecimiento del ovario en flores polinizadas y no polinizadas.....	78
Desarrollo del fruto.....	78
Análisis estadísticos.....	79
RESULTADOS .....	79
Patrón de fructificación .....	79
Caída de flores .....	80
Crecimiento de flores polinizadas y no polinizadas .....	84
Caída de frutos.....	86
Crecimiento del fruto.....	88
DISCUSIÓN.....	88

## **4. RESERVAS DE ALMIDÓN EN EL OVARIO Y PROCESO REPRODUCTIVO EN AGUACATE**

INTRODUCCIÓN.....	95
MATERIALES Y MÉTODOS.....	99
Establecimiento de las poblaciones de flores .....	99
Preparaciones para el microscopio .....	101
Análisis de imagen y evaluación del contenido de almidón.....	101
Determinación del tamaño del ovario.....	102
Análisis estadísticos.....	103
RESULTADOS .....	103
Contenido de almidón en flores en antesis .....	103
Almidón en el estilo.....	107
Evolución del contenido de almidón en el ovario en los días posteriores a antesis ...	108
Contenido de almidón en el ovario y en el estilo .....	109
Estado nutritivo y destino de la flor .....	110
DISCUSIÓN.....	111
El almidón en el estilo y en el ovario .....	112
Variabilidad entre flores en el contenido de almidón.....	113
El almidón está relacionado con el destino de la flor.....	114

## **PARTE III: IMPLICACIONES AGRONÓMICAS**

### **5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN UNA COLECCIÓN DE CULTIVARES DE AGUACATE Y GENOTIPOS LOCALES ESPAÑOLES USANDO SSRs**

RESUMEN .....	117
INTRODUCCIÓN.....	118
MATERIALES Y MÉTODOS.....	120
Material vegetal.....	120
Extracción de ADN y análisis de SSRs.....	120
Análisis de datos.....	123
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	124
Polimorfismo de SSRs y diversidad genética.....	124
Identificación de las diferentes accesiones.....	126
Relaciones de similitud entre accesiones .....	132

## **6. EFECTO DE LA DISTANCIA ENTRE CULTIVARES COMPLEMENTARIOS EN LA TASA DE FECUNDACIÓN CRUZADA Y EN LA PRODUCCIÓN EN EL CULTIVAR HASS**

INTRODUCCIÓN.....	137
MATERIALES Y MÉTODOS.....	141
Material vegetal.....	141
Efecto de la distancia en la tasa de fecundación cruzada y en la producción .....	141
Variación de la tasa de fecundación cruzada en el tiempo.....	143
Relación entre características de los frutos y el polinizador .....	143
Extracción de ADN y análisis de SSRs.....	144
Análisis de paternidad .....	144
Análisis estadístico .....	145
RESULTADOS .....	145
Efecto de la distancia a la fuente donadora de polen en la tasa de alogamia .....	145
Efecto de la distancia al polinizador en la producción .....	146
Aborto selectivo de frutos .....	147
Variación de la tasa de fecundación cruzada a lo largo del tiempo.....	149
Características de los frutos en base al parental masculino.....	150
DISCUSIÓN.....	151
Efecto de la distancia entre cultivares en la fecundación cruzada.....	151
Relación entre fecundación cruzada y producción.....	153
Caída selectiva de frutos.....	154

## **7. SELECCIÓN DE POTENCIALES POLINIZADORES PARA EL CULTIVAR ‘HASS’ EN EL SURESTE ESPAÑOL EN BASE AL SOLAPE DE SUS ETAPAS DE FLORACIÓN Y ESTADÍOS SEXUALES**

RESUMEN.....	159
INTRODUCCIÓN.....	160
MATERIALES Y MÉTODOS.....	163
Condiciones climáticas.....	163
Material vegetal y etapa de floración .....	163
Seguimiento del ciclo floral.....	164
Eficiencia de los polinizadores en campo .....	165
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	165
Fenología de la floración .....	165
Ciclo floral diario .....	167
Diferencias en el cuajado final .....	171
Conclusión.....	172

## DISCUSIÓN GENERAL

La polinización como factor limitante.....	173
Diferencias en la germinación de polen <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	175
El incremento de la temperatura acorta el periodo efectivo de polinización.....	176
Las reservas nutritivas de la flor juegan un importante papel determinando el destino de la flor .....	179
El aumento de la tasa de fecundación cruzada no significa necesariamente un aumento en la producción.....	181
La caída de frutos no ocurre de forma selectiva.....	183

<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>187</b>
---------------------------	------------

<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>189</b>
--------------------------	------------

## ANEXOS

ANEXO 1: Molecular characterization and genetic diversity in an avocado collection of cultivars and local Spanish genotypes using SSRs.

ANEXO 2: Selection of potential pollinizers for ‘Hass’ avocado base on flowering time and male-female overlapping.

## Resumen

España es el único país europeo con una producción comercial significativa de aguacate, principalmente en las costas de Málaga y Granada. El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un frutal tropical nativo de América central y Méjico que pertenece a la familia de las Lauráceas incluida en el orden Laurales, dentro del complejo Magnoliid de Angiospermas basales. El aguacate muestra dicogamia protogínica; cada flor abre dos veces, la primera siendo funcionalmente femenina, y la segunda como masculina. Uno de los principales limitantes en la producción de esta especie es que solo una pequeña proporción de flores (menos del 1%) se convierte finalmente en fruto. El objetivo principal de esta tesis consiste en el estudio de la biología reproductiva para determinar las causas de la baja tasa de cuajado. Este objetivo general se desarrolla en tres subobjetivos (1) el estudio de la fase progámica, desde la polinización a la fecundación bajo las condiciones ambientales del sureste de España en ‘Hass’, el cultivar más importante a nivel mundial, (2) el establecimiento de la influencia de la polinización y del estatus nutritivo de las flores en el cuajado y, finalmente, (3) las implicaciones agronómicas de la biología reproductiva de la especie.

La temperatura tuvo un claro efecto sobre la fase progámica. Se observaron diferencias en el comportamiento del polen en base al origen racial; así, los cultivares de raza Mejicana, Guatemalteca y sus híbridos son los que mejor se adaptan a nuestras condiciones de cultivo. Las altas temperaturas aceleraron el crecimiento del tubo polínico y la degeneración del óvulo. Bajo condiciones de temperatura de 20-25°C y humedad relativa de 75-95%, la capacidad del estigma de permitir la germinación de polen se mantiene en el estadio masculino lo que podría explicar la alta tasa de autofecundación y la producción en parcelas monovarietales. Además, aunque el aguacate se ha descrito como una especie con una marcada dicogamia protogínica, es frecuente observar flores en diferentes estadios sexuales coexistiendo en el mismo árbol o entre árboles de la misma variedad; este solape entre flores en estadio masculino y femenino podría ser considerado como una estrategia que asegura la fecundación cuando las oportunidades de fecundación cruzada son limitadas.

La determinación del patrón de caída de flores y frutos indicó que la polinización es un factor limitante en la producción, aunque no el único. Con el fin de estudiar factores adicionales se analizó la influencia de las reservas nutritivas de la flor en anthesis en el cuajado, observándose una estrecha relación entre el contenido de



almidón y la capacidad de la flor de transformarse en fruto, lo que sugiere que las reservas nutritivas en la flor de aguacate podrían jugar un papel importante en el éxito reproductivo, siendo una condición necesaria aunque no suficiente para el cuajado.

En aguacate, tradicionalmente se ha considerado que la plantación de cultivares complementarios en proximidad incrementa la producción, aunque actualmente las implicaciones de la fecundación cruzada en la producción es objeto de una gran controversia. Por esta razón, se determinó la tasa de fecundación cruzada en el momento de la cosecha en varios árboles de ‘Hass’ situados a diferente distancia de una parcela de ‘Fuerte’ (el cultivar más frecuentemente empleado como polinizador en España) y no se observó un efecto de la distancia en la producción. Debido a ello y a la asincronía en las etapas de floración entre ‘Hass’ y ‘Fuerte’, se decidió buscar polinizadores adicionales que idealmente presenten frutos similares a los de ‘Hass’. Con este objetivo, se determinó la duración de la etapa de floración y el solape entre estadios sexuales en varios genotipos. Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto que ‘Nobel’ y ‘Marvel’ podrían ser usados como polinizadores alternativos o complementarios a ‘Fuerte’ en el sureste español.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen a un mejor conocimiento de la biología reproductiva en aguacate y proporcionan pistas para un manejo adecuado del cultivo lo que puede permitir incrementar la producción utilizando las propias estrategias intrínsecas a la flor.

## Summary

Spain is the only European country with a significant commercial production of avocados, mainly in the coasts of Malaga and Granada. The avocado (*Persea americana* Mill.) is an evergreen subtropical fruit tree native to Central America and Mexico. It is a member of the Lauraceae, a mostly subtropical or tropical family included in the basal angiosperm clade Magnoliidae within the order Laurales. Avocado shows protogynous dichogamy where each flower opens twice: first functionally as female, then the flower closes and reopens the next day functionally as male. One of the main problem in avocado production worldwide is that only a very small fraction of the flowers (less than 1%) are able to set fruits. The main objective of this thesis is the study of avocado reproductive biology to analyze the causes leading to this low fruit set. This general objective is developed along three objectives (1) the analysis of the progamic phase, from pollination to fertilization under the environmental conditions of Southern Spain in ‘Hass’, the most important cultivar worldwide, (2) the establishment of the influence of pollination and flower nutritive status on fruit set and, finally, (3) the agronomical implications of avocado reproductive biology.

Temperature had a clear effect on the progamic phase. Differential pollen behaviour was observed based on racial origin; thus, the Mexican and Guatemalan cultivars and their interracial hybrids are the best adapted to our environmental conditions. High temperatures accelerated pollen tube growth and ovule degeneration. Under temperature conditions of 20-25°C and relative humidity of 75-95%, the capacity of the stigma to support pollen germination is maintained at the male stage. This could explain the high self pollination rate and the yield obtained in solid blocks of single cultivars. Moreover, although avocado has been described as a species with a marked protogynous dichogamy, it is common to observe flowers in different sexual stages at the same time among trees of the same genotype and even within the same tree; the overlapping between flowers in both male and female stages can be considered as a bet-hedging strategy to ensure fertilization and seed production when the opportunities for outcrossing are limited.

An examination of flower and fruit drop patterns showed that pollination is a limiting factor for production but not the only one. As a next step, we analyzed the influence of the starch reserves of the flower at anthesis on fruit set, and a significant



## Summary

relationship was found between the amount of starch and the capacity of a flower to set a fruit, suggesting that nutritive reserves in avocado flowers could play an important role on fruit set, being a necessary although not sufficient condition for fruit setting.

It has been traditionally considered that interplanting complementary cultivars in close proximity significantly increases yield in avocado, although the relative impact of outcrossing in final yield is still under debate. For this reason, we determined the outcrossing rate at harvest time on several ‘Hass’ trees situated at different distances from a ‘Fuerte’ (the most commonly cultivar used as pollen donor in Spain) plot and no effect was found in yield. Due to this and to the asynchrony between flowering periods of those two cultivars we decided to find additional pollinizers, ideally producing Hass-like fruit. With this objective, the length of the blooming period, the overlapping in sexual stages and fruit set was studied in several genotypes. Results herein indicate that ‘Marvel’ and ‘Nobel’ could be an interesting alternative to the current use of ‘Fuerte’ as pollinizer for ‘Hass’ in Southeastern Spain.

These results contribute to a better understanding on the evolution of reproductive biology of avocado. But they also provide clues for an adequate management of crop that could allow an increase in production using the strategies already developed in the flowers.



## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1. El aguacate (*Persea americana* Mill.)

#### 1.1. Taxonomía y origen

El aguacate (*Persea americana* Mill.) pertenece a la familia de las Lauráceas incluida en el orden Laurales que, junto con los órdenes Canellales, Magnoliales y Piperales, forman el complejo Magnoliid (Zanis et al., 2002), dentro de las Angiospermas basales. Este complejo está constituido por varios miles de especies, algunas de ellas de importancia económica, pero, sobre todo, de gran interés para comprender la evolución de las Angiospermas. Estas especies se encuentran distribuidas a través de áreas tropicales y templadas de todo el mundo (Judo et al., 2002; Soltis, 2005).

Dentro del orden Laurales se encuadran 7 familias (*Atherospermataceae*, *Calycanthaceae*, *Gomortegaceae*, *Hernandiaceae*, *Lauraceae*, *Monimiaceae* y *Sipuranaceae*) siendo la familia de las Lauráceas la más amplia del orden (Buzgo et al., 2007). Las Lauráceas comprenden 50 géneros y un número indefinido de especies que oscila entre 2.500 y 3.000 distribuidas en regiones tropicales y subtropicales. Dentro de las Lauráceas existen numerosas especies de importancia económica, como la canela (*Cinnamomum verum*), el laurel (*Laurus nobilis*) o el alcanfor (*Cinnamomum camphora*) siendo la más importante el aguacate. Tradicionalmente dentro del género *Persea* se han diferenciado dos subgéneros: *Persea* y *Eriodaphne* (Kopp, 1966); sin embargo, actualmente tienden a considerarse como dos géneros distintos (Campos-Rojas et al., 2007).

El origen del aguacate se sitúa en la región geográfica comprendida desde el este hasta las tierras altas de Méjico, a lo largo de Guatemala y la costa del Pacífico de América Central (Popenoe, 1920). La especie alcanzó Mesoamérica hace 1,6 millones de años durante los cambios climáticos del Pleistoceno, y proliferó en los distintos hábitat disponibles en aquellas zonas (Chanderbali et al., 2001).



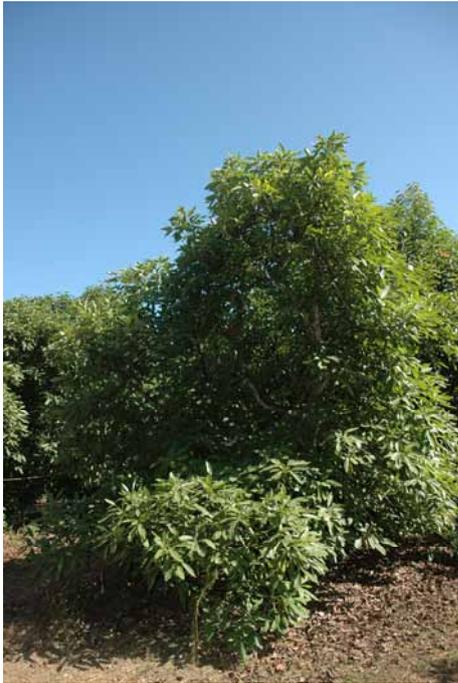
La primera evidencia del contacto humano con este frutal se remonta a hace 9.000-10.000 años en Puebla (México), donde se han encontrado restos de cotiledones de aguacate. El aguacate fue uno de los primeros frutales domesticados, por lo que podría ser considerado como un patrón de referencia para abordar el estudio de los procesos de domesticación en el Neotrópico (Galindo-Tovar et al., 2008).

Dentro del subgénero *Persea*, Scora et al. (2002) distinguieron 3 especies: *P. schiedeana*, *P. parviflora* y *P. americana*; a su vez esta última incluye 8 variedades botánicas bien definidas, de las que 5 carecen de importancia comercial (*floccosa*, *zentyerii*, *steyermarkii*, *nubigera* y *tolimanensis*). Las otras tres, tradicionalmente se han descrito como razas o variedades botánicas en base a diferencias morfológicas, ecológicas y características moleculares: Antillana (*P. americana* var. *americana*), Guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis*) y Mejicana (*P. americana* var. *drymifolia*). Trabajos moleculares realizados con minisatélites (Mhameed et al., 1997) indican que las razas Guatemalteca y Antillana son más parecidas entre ellas que a la raza Mejicana. Ashworth y Clegg (2003), mediante microsátélites, distinguieron claramente los tres grupos y describieron otros subgrupos intermedios constituidos por genotipos híbridos.

Cada raza tiene un origen geográfico determinado (Heiser, 1965; Kopp, 1966; Williams, 1977; Storey et al., 1986) y se encuentra adaptada a diferentes condiciones ecoclimáticas; así, los cultivares de raza Antillana son árboles de los bosques húmedos y calurosos de tierras bajas de América Central. El hábitat nativo de la raza Mejicana consiste en regiones más frías situadas a alturas de 1400-2500 metros. La raza Guatemalteca es la más sensible a las condiciones extremas, de ahí que su hábitat sean las zonas templadas húmedas (Papadakis, 1966). Como consecuencia de la amplia distribución del germoplasma de aguacate, desplazado de sus lugares de origen, se han llevado a cabo frecuentes cruces interraciales, y, actualmente, los cultivares más importantes económicamente son híbridos interraciales.



## 1.2. Características botánicas



**Figura 1.** Árbol de aguacate de la variedad Hass.

El árbol de aguacate es de hoja perenne y en sus zonas de origen puede alcanzar alturas desde 10-15m (raza Mejicana) a 30m (Guatemalteca y Antillana) (Scora et al., 2002) aunque en plantaciones comerciales generalmente se intenta mantener a una altura de unos 7 metros para facilitar su manejo y recolección. El sistema radicular no es muy profundo y no se extiende más allá de la zona que cubre el follaje, aunque también se observan raíces de anclaje que penetran en el suelo hasta 3-4 metros de profundidad (Whiley, 1992).

Las hojas en estado juvenil son enteras, pubescentes y rojizas adoptando posteriormente una forma coriácea, lisa y de tonalidad verde oscuro. Las flores son hermafroditas, actinomorfas, y aparecen agrupadas en panículas axilares o terminales; son flores pequeñas de color verde amarillento y pubescente. El cáliz está compuesto por seis tépalos unidos en la base. Cada flor consta de un perigonio con dos verticilos trímeros, 12 estambres insertos debajo o alrededor del ovario, de los cuales sólo 9 son funcionales, repartidos en 4 verticilos con tres miembros por verticilo que se dividen en exteriores (sin nectarios) e interiores. Las flores presentan un pistilo único con un ovario súpero, unilocular que contiene un único óvulo. El estigma es lobulado y el estilo es delgado (Bergh, 1969). Las yemas florales generalmente son mixtas y contienen primordios florales latentes y un ápice vegetativo terminal. Las inflorescencias pueden ser indeterminadas, que permiten continuar con el crecimiento vegetativo del árbol, o determinadas, que terminan en una yema floral que no continuará el crecimiento vegetativo. Los primordios florales se encuentran normalmente en yemas terminales, apareciendo en primavera-verano (Davenport, 1982). Un árbol



puede tener cientos de inflorescencias y miles de flores, aunque el número de flores por inflorescencia puede variar mucho dependiendo del cultivar, siendo el porcentaje de cuajado extremadamente bajo (Bergh, 1986).

El fruto es una baya con mesocarpo carnoso rodeando una gran semilla y puede presentar tamaños (50-2000g) y formas (redondeadas, oval, piriforme) muy variables (Scora et al., 2002).

La semilla consiste en una cubierta que rodea a dos cotiledones carnosos y a un pequeño eje embrionario. La degeneración y oscurecimiento de la cubierta de la semilla indica que se ha completado el proceso de maduración y en este momento se encuentra separada de la pulpa. Los frutos pueden permanecer en el árbol de 3 a 6 meses desde el comienzo de la época de recolección haciendo posible el almacenamiento de la fruta en el árbol y una cosecha escalonada (Kaiser y Wolstenholme, 1994). Dependiendo de la raza, los frutos varían en la época de maduración, tamaño y contenido en ácidos grasos. Los frutos de las razas mejicanas y guatemalteca tienen mayor contenido en ácidos grasos en el mesocarpo maduro (10-30%) que los de la raza antillana (3-10%).

### **1.3. Situación actual del cultivo**

#### **1.3.1. El cultivo del aguacate en el mundo**

La producción mundial de aguacate ha sido estimada en aproximadamente 3.400.000 t aunque el 70% de esta producción está concentrada en un número reducido de países (Méjico, Indonesia, EE.UU., Colombia, Brasil, Chile, República Dominicana y Perú), siendo Méjico el mayor productor mundial con más de 1 millón de toneladas en 100.000 ha y el 34% de la producción mundial en 2006 (FAOSTAT, 2009). En los últimos 30 años la superficie destinada al cultivo del aguacate en el mundo se ha duplicado. Así, en 1980 la superficie de cultivo era de 188.000 ha con una producción de 1.558.000 t frente a las 407.000



ha actuales. En la tabla 1 se muestra la superficie destinada al cultivo y la producción de aguacate en los principales países productores.

**Tabla 1.** Producción y superficie de cultivo en los principales países productores.

<b>País</b>	<b>Superficie (ha)</b>	<b>Producción (t)</b>
<b>Méjico</b>	106.000	1.140.000
<b>Indonesia</b>	50.000	250.000
<b>EE.UU.</b>	27.000	250.000
<b>Colombia</b>	18.000	200.000
<b>Chile</b>	27.000	167.000
<b>Brasil</b>	10.500	165.000
<b>Perú</b>	13.500	120.000
<b>Rep. Dominicana</b>	8.800	115.000

### **1.3.2. El cultivo del aguacate en España**

Aunque la introducción del aguacate en España se atribuye a los colonizadores a comienzos del siglo XVI, las primeras plantaciones y su desarrollo comercial tuvieron lugar en la segunda mitad del siglo XX, particularmente a partir de los años 70 (Farré y Pliego, 1987) mientras que la fijación del cultivo tuvo lugar entre 1970 y 1975 (García, 2003).

España es un caso singular en el cultivo del aguacate puesto que es el único país europeo con una producción comercial significativa de aguacates, que alcanzó 82.000 t en el año 2006 (FAOSTAT, 2009). En España, su cultivo se limita a la zona del litoral de Málaga, Granada, Almería, Valencia y las Islas Canarias, por presentar características climáticas propias de climas subtropicales. Actualmente la superficie destinada al cultivo es de 10.000 ha. Aunque gran parte de la producción de aguacate en España se destina a la exportación, su consumo a nivel nacional también se ha incrementado de forma considerable a partir de la década de los 80. La principal provincia productora es Málaga con 6.110 ha, seguida de Granada con 2.685 ha. En Canarias existen 764 ha (676 en Tenerife) y un número muy escaso en otras provincias (Cádiz, Huelva, Alicante, Almería, Sevilla, Baleares y Castellón) (MAPA, 2009).



Las razas Guatemalteca y Mejicana y sus híbridos son las que mejor se adaptan a las condiciones climáticas de la Península mientras que en las islas Canarias se pueden cultivar aguacates de raza antillana. El 75 % de la producción de aguacate se centra en la variedad Hass, y el resto principalmente en ‘Bacon’ y ‘Fuerte’.

### **1.4. Exigencias de cultivo**

El cultivo de del aguacate se ve dificultado debido a su estrecha capacidad de adaptación a un amplio rango de condiciones climáticas. Las tres razas botánicas presentan diferencias en cuanto a los requisitos climáticos; así, las condiciones óptimas de cultivo varían desde climas muy cálidos a climas subtropicales más fríos. La raza Antillana se adapta bien a climas cálidos y secos (pero con alta humedad relativa) mientras que, las razas Mejicana y Guatemalteca pueden cultivarse bien en áreas más templadas o subtropicales más frescas. El aguacate puede desarrollarse en suelos de una amplia variedad de texturas, incluso en suelos arcillosos y franco-arcillosos siempre que exista un buen drenaje, siendo el suelo de textura ligera el óptimo (Rosenberg, 1987). Debido a que es extremadamente sensible al exceso de humedad necesita de suelos bien drenados y profundidades de aproximadamente 1 metro libre de capas freáticas. El pH óptimo es ligeramente ácido, cercano a 6 y su contenido de materia orgánica óptimo es de aproximadamente un 2% al menos en el horizonte A.

### **2. Problemática del cultivo**

El principal problema en la producción de aguacate es la baja tasa de cuajado unido a una producción alternante. Este frutal presenta una exuberante floración, ya que produce más de un millón de flores por árbol de las que sólo una pequeña proporción alcanzan su estado de madurez, considerándose una buena cosecha la de 300 frutos por árbol (Lahav y Zamet, 1999). El porcentaje de



cuajado oscila entre 0,001 a 0,23% (Sedgley, 1980) y es variable en función del cultivar.

## **2.1. Producción alternante**

La producción alternante consiste en que en este cultivo alternan años de alta producción de flores y buena cosecha con años de baja producción de flores y escasa cosecha. Este comportamiento se ha explicado mediante el aumento en el nivel de giberelinas ocasionado por el exceso de frutos en los años de alta producción; estas hormonas inhibirían la inducción floral (Sedgley et al., 1985) disminuyendo la producción de flores en el siguiente año. Este fenómeno también está asociado a las reservas de hidratos de carbono, en la rama y en tronco, que juegan un importante papel en la diferenciación de las yemas florales. Los niveles más altos se encuentran en el momento anterior a la floración y van disminuyendo a medida que los frutos van creciendo. En años de alta producción, las reservas de almidón se ven muy mermadas en el momento de la diferenciación floral, y se alcanza una relación entre carbohidratos y reservas nitrogenadas descompensada a favor de estas últimas, lo cual afecta a la diferenciación floral (Calabrese, 1992).

## **2.2. Plantación de cultivares complementarios para incrementar la producción**

En determinadas regiones la productividad de este cultivo es muy superior al resto de áreas productoras. Así, en Israel la producción es de 18 t/ha; en el caso de Perú así como en Estados Unidos es de 9 t/ha (Faostat, 2007), mientras que en España la producción media es de 6,6 t/ha. Estos datos sugieren que mejorando las prácticas de cultivo y el manejo sería posible incrementar la producción de forma considerable; sin embargo, nos encontramos con la limitación de que no es posible extrapolar las prácticas de cultivo entre países debido al efecto de las condiciones ambientales en la fase reproductiva. Como



consecuencia de las razones expuestas anteriormente (comportamiento floral, caída selectiva, condiciones ambientales, etc.) se han llevado a cabo numerosos trabajos en distintos países con la finalidad de buscar solución o mermar los problemas de producción que en parte son debidos al comportamiento floral del aguacate.

En bloques compactos de una sola variedad se obtienen cosechas satisfactorias (Gazit, 1977, Degani y Gazit, 1984; Davenport, 1986), debido a que es frecuente el solape de flores en distintos estadíos en un mismo cultivar (Hodgson, 1947; Degani et al., 1989; Davenport y Lahav, 1992; Whiley y Winston, 1987) bajo determinadas condiciones climáticas (Gardiazábal y Rosenberg, 1991; Vithanage, 1990; Davenport, 1986; Robinson y Savage, 1926; Sedgley y Grant, 1983; Davenport, 1989), siendo el grado de solape variable en función de la variedad (Papademetriou, 1976). Tradicionalmente, para asegurar una adecuada polinización y optimizar la producción se ha recomendado la plantación intercalada de cultivares complementarios (Degani et al., 1989; Bergh y Gustafson, 1958; Bergh y Garber, 1964; Gustafson, 1967; Bergh y Gustafson, 1966, Bergh, 1968; Bergh, 1977; Degani et al., 1997a; Arpaia et al., 2005) o injertar ramas de cultivares complementarios (Bekey, 1989), aunque esta última práctica conlleva una serie de problemas a la hora del manejo del cultivo. Se estima que distancias superiores a 80 metros entre cultivares complementarios disminuye de forma significativa la tasa de polinización cruzada (Vrecenas-Gadus y Ellstrans, 1985) aunque, según algunos autores, la polinización cruzada puede tener lugar a una distancia bastante considerable de la fuente donadora de polen (Ellstrand, 1992; Bergh, 1968). Sin embargo, los beneficios del empleo de cultivares complementarios en la producción se han discutido durante mucho tiempo (Goldring et al., 1987; Garner et al., 2008) y muestran gran variación en función de la zona de estudio (Kobayashi et al. 2000).



### 2.3. Plagas y enfermedades del aguacate

Uno de los principales factores limitantes de la producción de aguacate en distintas zonas productoras es la presencia de hongos de suelo que afectan a las raíces del árbol. A nivel mundial la enfermedad radicular más extendida es la podredumbre radicular causada por *Phytophthora cinnamoni* y cuya sintomatología consiste en un aspecto de marchitez con defoliación de la copa, lo cual se traduce en un progresivo decaimiento del árbol llegando a secarse ramas en un estadio avanzado de la enfermedad. En la propagación de la enfermedad, el agua juega un importante papel junto con las labores de labranza y la plantación de plantas infectadas procedentes de viveros. La enfermedad se ve favorecida por una temperatura comprendida entre 15 y 18°C junto por condiciones de elevada humedad, niveles freáticos altos y suelos de textura pesada. Actualmente se están empleando patrones clonales que muestran resistencia a este hongo, entre ellos ‘Duke 7’, ‘Thomas’, ‘Dusa’ o ‘Toro Canyon’.

Aunque en España también está presente *Phytophthora cinnamoni*, existe otro hongo que es especialmente importante en nuestras condiciones, *Rosellinia necatrix*, causante de la podredumbre blanca radicular. Esta enfermedad fue detectada por primera vez en España en 1987 (López Herrera, 1989) situándose actualmente la incidencia de *R. necatrix* en un 47% de las fincas con árboles sintomáticos. La sintomatología consiste en un amarillamiento de las hojas, detención del crecimiento de los brotes, caída prematura de las hojas y marchitamiento de los frutos. En el sistema radicular, los síntomas se manifiestan con la pudrición de pequeñas raíces por el micelio del hongo que, posteriormente, se expandirá a raíces de mayor tamaño provocando su ennegrecimiento. La invasión se expande a través del córtex y cambium del tronco. Si la infección es severa, la evolución de la enfermedad es rápida y puede producirse la muerte del árbol tras varias semanas de la observación de los primeros síntomas. El micelio requiere elevados niveles de oxígeno para su desarrollo así que se encuentra limitado a los horizontes más superficiales. En España, se ha observado que el patógeno puede persistir durante muchos años en



los restos de olivos, vid y almendro (López Herrera et al., 1998). La lucha contra la podredumbre radicular causada por *R. necatrix* debe ser abordada desde un control integrado que incluya métodos físicos, químicos, control biológico y el uso de material vegetal tolerante a la enfermedad.

Respecto a las plagas, una de las más importantes es la del ácaro cristalino (*Oligonychus perseae*) cuya presencia fue detectada en plantaciones comerciales en el sureste español a mediados del año 2004. Forman colonias en el envés de las hojas y tanto las ninfas como los adultos chupan los jugos de las hojas causando amarilleo principalmente a lo largo de las nervaduras, secando el follaje cuando el ataque es severo. Esta nueva plaga se ha extendido causando daños generalizados en la masa foliar de los árboles y actualmente se están desarrollando estrategias de control biológico (Gonzalez-Fernández et al., 2008; Montserrat et al., 2008).

Existen otras plagas que afectan al cultivo (Wysoki et al., 2002) entre las que se pueden destacar dos, la araña roja y los trips. La araña roja (*Oligonychus yothersi* M.G.) se localiza sobre la cara superior de las hojas a lo largo de la nervadura central y el daño causado es por succión que origina un cambio de coloración de la hoja verde a cobriza, y afecta gravemente a la capacidad fotosintética de la hoja. Ataques severos originan defoliación. Existe un control natural de esta plaga y viene dado por la actuación del coleóptero *Oligota pygmaea* y el depredador *Stethorus sp.* Respecto a los thrips, esta plaga lesiona hojas y frutos de aguacate como resultado de su alimentación en las capas de células de la epidermis ocasionando áreas pálidas y estas lesiones se convierten en puntos de entrada para microorganismos patógenos. En los frutos, provocan cicatrices y malformaciones que en ocasiones originan su caída y por otra parte reducen su valor comercial. Las especies de trips a la que se han asociado estos daños son las siguientes: *Heliothrips haemorrhoidalis*, *Selenothrips rubrocinctus*, *S. aceri* y *Scirtothrips perseae*. Todavía no está presente en España aunque sí está causando problemas importantes en otras regiones como California.



Otras plagas que afectan al aguacate son la del perforador de frutos (*Stenomema catenifer*), gusano arrollador de la hoja (*Platynota spp*), taladrador de la semilla (*Heilipus*) y taladrador del tronco (*Copturomimus persea*) (Wysoki et al., 2002).

### **3. Biología reproductiva**

Los principales problemas de producción que presenta el aguacate se han achacado a una polinización deficiente así como a una importante caída de flores y de la mayor parte de los pequeños frutos en fases iniciales de desarrollo; estos procesos tienen lugar durante la fase reproductiva por lo que un conocimiento de esta fase resulta fundamental para optimizar la producción en esta especie.

#### **3.1. Biología floral del aguacate**

Nirody (1922) se considera como el precursor en los estudios de comportamiento floral en esta especie. El aguacate presenta un comportamiento floral peculiar conocido como dicogamia protogínica. Sus flores son hermafroditas, pero los órganos masculinos y femeninos no son funcionales en el mismo momento, madurando estos últimos en primer lugar. Así, cada flor experimenta una doble apertura (diantesis); la primera vez se abre como flor funcionalmente femenina (estigma receptivo y anteras no dehiscentes), se cierra para abrirse el día siguiente como flor funcionalmente masculina (el estigma deja de ser receptivo y las anteras se vuelven dehiscentes).

Las flores en estado femenino presentan el pistilo erecto y el estigma se muestra blanquecino, mientras que los estambres se encuentran reposados sobre los tépalos. Cuando la flor abre en estado masculino muestra un aspecto muy diferente al anterior, apareciendo en este caso el pistilo marrón y 3 de las anteras en proximidad al pistilo mientras que las otras 6 aparecen inclinadas (Bringhurst, 1952) (Figura 2).



En base a su comportamiento floral, los distintos cultivares de aguacate se han clasificado en dos grupos: A y B (Stout, 1923). Los cultivares de tipo A son aquellos cuyas flores se abren en estado femenino por la mañana y se cierran por la tarde para abrirse de nuevo en estado masculino la tarde del día siguiente, pero, en este momento, el estigma ya no es receptivo (Sedgley, 1979; Gardiazábal y Rosenberg, 1991). Las flores de los cultivares tipo B se abren en estado femenino durante la tarde, se cierran y vuelven a abrirse la mañana del día siguiente en estado masculino.

Por lo tanto, si la dicogamia protogínica fuese estricta, la fecundación cruzada sería obligada (Goldring et al., 1987) y este peculiar comportamiento floral se considera como un mecanismo encaminado a evitar la autofecundación. No obstante, este fenómeno es altamente dependiente de las condiciones ambientales, fundamentalmente temperatura (Ish Am y Eisikowih, 1991; Sedgley, 1977b; Sedgley y Annells, 1981) variando la sensibilidad en función del cultivar (Bergh, 1969). De este modo, en parcelas monovarietales se pueden obtener producciones satisfactorias como resultado de procesos de autofecundación. La autofecundación se explica, en la mayoría de los casos, por la coexistencia de flores abiertas funcionalmente femeninas y otras funcionalmente masculinas en el mismo árbol o entre árboles diferentes de la misma variedad, fenómeno que ocurre frecuentemente en determinados momentos del día dependiendo de las condiciones ambientales (Degani y Gazit, 1984, Davenport, 1986; Ish-Am y Eisikowith, 1991). Sin embargo, también puede tener lugar autofecundación en la misma flor en estado masculino siempre que el estigma y el óvulo todavía sean receptivos.

Estudios llevados a cabo por Davenport (1989) ponen de manifiesto que en Florida, en condiciones subtropicales húmedas, la mayor cantidad de granos de polen se depositan en el momento en que la flor abre en estado masculino (90%); esto hace pensar que la mayoría de la producción en esas condiciones podría ser debida a procesos de autofecundación, realizándose esta deposición mediante la intervención del viento (Davenport, 1992) y sugiriendo que la flor en



estado masculino sigue siendo receptiva. Sin embargo, en condiciones más secas como Israel o California la fecundación cruzada tiene una mayor importancia (Degani et al., 1989, 1994, 1997, 2003; Garner et al., 2008). Por lo que respecta a España, hasta ahora no se habían realizado estudios de este tipo por lo que la evaluación de este comportamiento es uno de los objetivos de este trabajo.



**Figura 2.** Flores abiertas en estado femenino, masculino, y la coexistencia de ambos estados en un mismo árbol.

### 3.2. Polinización

La polinización consiste en la transferencia de polen desde las anteras hasta el estigma y es un proceso de especial importancia en los procesos reproductivos de plantas con flores siendo un requisito indispensable para asegurar el cuajado. La polinización ineficiente se ha considerado como uno de los principales factores causantes de bajas producciones en el cultivo del aguacate en la mayoría de los países productores (Gazit y Degani, 2002; Wysoki et al., 2002).

Los problemas de polinización, en gran parte, son ocasionados por la peculiar biología reproductiva de este frutal. En el caso del aguacate, existen tres formas de polinización:

a) Autogamia: cuando el polen procede de las anteras de la misma flor. En determinados cultivares como ‘Fujikawa’ las anteras liberan un poco de polen al final del estado femenino (Papadimitriou, 1976).



b) Geitonogamia: se trata de otro tipo de autopolinización, que es indistinguible del anterior, pero en este caso el polen procede de las anteras de otra flor del mismo cultivar sea del mismo árbol o de otros árboles cercanos. Ésta sucede cuando tiene lugar el solape entre estadios sexuales.

c) Alogamia: el polen procede de otros cultivares.



**Figura 3.** Abeja polinizando una flor en estado femenino.

La polinización en aguacate es entomófila. Aunque varias especies de insectos actúan como polinizadores en América Central y Méjico, sobre todo especies de himenópteros sin aguijón nativas de esas regiones (Wysoki et al., 2002), la abeja melífera es el polinizador más frecuente en la mayoría de las regiones productoras (Ish-Am y Eisikowith, 1993; 1998; Robbertse et al., 1998). Para que la polinización sea efectiva, las abejas deben visitar una gran cantidad de flores en los dos estadios florales (Shoval, 1987) y deben depositar por lo menos 20 granos de polen en el estigma (Ish-Am, 1994). Aunque Bekey (1989) sugirió que la polinización se debe exclusivamente a los insectos debido a la naturaleza pesada y pegajosa del polen que dificultaría su movimiento por el viento, determinados trabajos apuntan a que el viento o la gravedad pueden jugar un papel importante en el movimiento del polen hasta los estigmas de las flores (Davenport, 2003; Davenport et al., 1994). A pesar de ser los vectores más extendidos en los distintos países productores, las abejas muestran mayor preferencia por el néctar de flores de otras especies, debido a que las flores de aguacate son poco atractivas y a que el néctar presenta un alto contenido en fósforo y en potasio que tienen un efecto repelente para las abejas (Afik et al. 2006).

El éxito de una buena polinización se basa en colocar una cantidad adecuada de colmenas por hectárea justo antes de que comience la floración (Gardiazábal y Rosemberg, 1991) tanto en el caso de plantaciones



monovarietales como en aquellas en las que se emplean cultivares complementarios en su comportamiento floral (Chandler, 1962).

### **3.3. Fase progámica**

La fase progámica es la fase comprendida entre la polinización y la doble fecundación del saco embrionario (Linskens, 1986). Durante este periodo tienen lugar una serie de importantes y complejas interacciones entre el gametofito masculino y los tejidos femeninos de la flor. Tradicionalmente se ha considerado que el pistilo jugaba un papel pasivo en esta fase siendo su única misión la de suministrar reservas nutritivas al tubo polínico durante su crecimiento relegándose el estudio de la interacción polen-pistilo al estudio de su implicación en los mecanismos de incompatibilidad. Posteriormente, esta interacción adquirió importancia existiendo actualmente información de procesos de comunicación célula-célula que se desencadenan en cruces compatibles (De Graaf et al., 2001; Wheeler et al., 2001; Johnson y Preuss, 2002; Higashiyama et al., 2003; Lord, 2003; Hiscock y Allen, 2008) y cada vez son más los trabajos que apoyan el hecho de que el pistilo juega un papel clave durante la fase progámica (Herrero, 1992) controlando la cinética del crecimiento del tubo polínico (Arbeloa y Herrero, 1987). A pesar de que el pistilo parece ser una estructura perfectamente diseñada para favorecer la fecundación, presenta una serie de mecanismos que dificultan el crecimiento de los tubos polínicos, por lo que juega un papel activo en el control del crecimiento del tubo polínico (Herrero y Hormaza, 1996; Hormaza y Herrero, 1999). El pistilo se trata de una estructura ampliamente conservada en las angiospermas, con un estigma que confiere un medio óptimo para que tenga lugar la germinación del grano de polen, un estilo que dispone de un tejido transmisor a través del cual crecerá el tubo polínico y, finalmente, un ovario donde ocurrirá el proceso de fecundación (Herrero y Hormaza, 1996), requisito indispensable para la posterior formación del fruto.



### 3.3.1. El estigma

En las plantas con flores, la interacción entre el polen y el estigma es el primer paso que conduce a la fecundación. El estigma puede ser considerado como una estructura modificada para la captura y recepción del polen que, además, confiere un medio óptimo para que tenga lugar la germinación del grano de polen y el crecimiento inicial del tubo polínico. Durante el contacto del grano de polen con el estigma tienen lugar una serie de uniones específicas y selectivas entre ambos que consisten en un rápido reconocimiento, hidratación y subsecuente germinación. En las angiospermas, los granos de polen maduros están parcialmente deshidratados (Franchi et al., 2002). Esta deshidratación se ha asociado a la carencia de un metabolismo activo (Hoekstra y Bruinsma, 1980; Buitink et al., 1998) que se reactiva cuando el grano de polen adquiere una presión osmótica adecuada tras su hidratación en el estigma.

El tiempo de hidratación del polen es muy variable oscilando en Brasicáceas desde 15 minutos en *Arabidopsis thaliana* a 60 minutos en *Brassica oleracea* (Preuss et al., 1993; Elleman y Dickinson, 1996). Durante este proceso, una gran cantidad de agua y nutrientes, junto a otras pequeñas moléculas, son transportados al interior del grano de polen bien desde el exudado estigmático en el caso de estigmas húmedos (Swanson et al., 2004), o desde las papilas estigmáticas en el caso de estigmas secos (Luu et al., 1997; Zinkl et al., 1999; Heizmann et al., 2000). Las enzimas secretadas por el polen intervienen en la invasión de la superficie estigmática (Green, 1894). Así, en la intina del grano de polen y en la pared del tubo polínico se ha puesto de manifiesto la acción de esterasas, amilasas, ribonucleasas, fosfatasas ácidas y actividad proteasa (Knox y Heslop-Harrison, 1970). Esta penetración estigmática ocurre de forma controlada para evitar la exposición del estigma a invasiones inapropiadas o a patógenos y este control requiere una estrecha comunicación polen-pistilo.

En estigmas húmedos, el almidón presente en las papilas estigmáticas va desapareciendo a medida que aumenta la secreción estigmática (Herrero y Arbeloa, 1989; Rodrigo y Herrero, 2002). La secreción estigmática favorece la



hidratación, germinación y el crecimiento del tubo polínico a través del espacio existente entre las papilas mientras que éstas van perdiendo su turgencia (Sanzol et al., 2003) y es el gametofito masculino el que induce la secreción en el estigma en especies como la sandía (Sedgley y Scholefield, 1980), chirimoyo (Vithanage, 1984) o melocotonero (Herrero y Arbeloa, 1989).

Así, entre las funciones que tiene el estigma podemos citar las siguientes: la adhesión del polen, que inicialmente depende de la interacción entre proteínas; la hidratación del polen, en la que la presencia de los lípidos juegan un importante papel, la activación y germinación del polen. En el momento de anthesis, el estigma es receptivo cuando es capaz de permitir la germinación de polen (Sanzol y Herrero, 2001; Rodrigo y Herrero, 2002; Yi et al., 2006). Por ello, las pruebas de receptividad estigmática se basan en la presencia de una actividad enzimática, la capacidad de permitir la germinación del polen y la capacidad de que tenga lugar la fecundación (Dafni y Maues, 1998).

En el caso del aguacate, el estigma es húmedo y produce un exudado rico en lípidos, carbohidratos, proteínas y minerales (Sedgley y Buttrose, 1978; Sedgley y Blesing, 1983) confiriendo las condiciones óptimas para que tenga lugar la germinación de polen. Una vez que el polen es depositado en el estigma, germina aproximadamente a los quince minutos y se produce una degeneración del citoplasma de las células papilares. En el momento en que germinan los granos de polen, se observan diferencias en el crecimiento entre ellos, de tal forma que Sedgley (1976) describió que la mitad de los granos de polen que germinan detienen su crecimiento en la parte basal del estigma. Papademetriou (1975b) sugirió la presencia de un posible inhibidor en aquellos tubos con una tasa menor de crecimiento.

### **3.3.2. Crecimiento del tubo polínico a través del estilo**

El crecimiento del tubo polínico en el estigma es fundamentalmente autótrofo (Herrero y Dickinson, 1981) aunque además de existir un movimiento



de agua y cationes, también se han encontrado evidencias de la existencia de una movilización de azúcares hacia el polen (Taylor y Hepler, 1997). Una vez que el tubo alcanza el tejido transmisor, el crecimiento se acelera (Herrero y Dickinson, 1979; Mulcahy y Mulcahy, 1983; Arbeloa y Herreo, 1987; Herrero y Dickinson, 1980) y su nutrición pasa a ser heterótrofa, nutriéndose a expensas de las reservas existentes en el tejido transmisor (Brewbaker y Majumder, 1961; Herrero y Dickinson, 1979; Singh et al., 1992; De Graaf et al., 2001) y demanda más energía puesto que ocurre de forma más rápida y las reservas van desapareciendo a medida que el tubo polínico crece. Esta aceleración coincide en las especies que liberan polen bicelular, que suponen el 70% de las Angiospermas (Brewbaker, 1967; Soltis et al., 2005), incluido el aguacate, con la división de la célula generativa en las dos espermatidas.

En la competición entre granos de polen en la fase autótrofa la expresión de genes del microgametofito adquiere gran importancia, puesto que los genes que se expresan en el núcleo vegetativo son los responsables del metabolismo de las reservas acumuladas para el crecimiento del tubo polínico y para muchas de las interacciones que tienen lugar entre polen-estigma y polen-estilo (Brewbaker y Majumder, 1961; Singh et al., 1992; De Graaf et al., 2001).

Frecuentemente, especialmente en especies con flores uniovulares, sobre el estigma se depositan más granos de polen de los que se necesitan para la fecundación de los óvulos de la flor (Stephenson, 1985; Winsor et al., 2000) lo que implica una intensa competición entre gametofitos masculinos en la que el tubo polínico más rápido será el que consiga fecundar al óvulo (Mulcahy, 1979; Hormaza y Herrero, 1992; 1994). Aquellos granos que no van a intervenir directamente en la fecundación podrían jugar un importante papel asistiendo al resto a conseguirlo, puesto que se ha comprobado que la acumulación de polen tiene un efecto sinérgico en la germinación (Hormaza y Herrero, 1996). Haldane (1932) diferenció claramente dos tipos de competición, la que tiene lugar entre granos de polen de diferentes individuos y la que acontece entre granos de polen de un mismo individuo. El crecimiento de los tubos polínicos a lo largo del estilo



es altamente competitivo, y el número de tubos polínicos que alcanzan el ovario es muy inferior al número de granos que germinan inicialmente (Tomer y Gottreich, 1975; Hormaza y Herrero, 1994, 1996, 1999). La intensidad de la competencia es proporcional a la longitud del estilo (Snow, 1986). De esta forma, esta competición que tiene lugar a lo largo del pistilo adquiere una gran importancia en el proceso evolutivo de las angiospermas (Mulcahy, 1979) puesto que aquellos genotipos cuyos tubos polínicos presenten ventajas en su crecimiento serán los que se vean mejor representados en la descendencia (Mulcahy y Mulcahy, 1975; 1987, Mulcahy, 1979; Hormaza y Herrero 1992, 1996) dando lugar a una fecundación no aleatoria basada en las diferencias genotípicas del grano de polen que se expresan durante el crecimiento del tubo polínico. Así, aquellos tubos polínicos que presenten una media de crecimiento superior producirán un mayor número de semillas (Stephenson y Berti, 1983; Snow y Spira, 1996; Herrero y Arbeloa, 1989). Sin embargo, el comportamiento del polen se ve afectado no solamente por el genotipo masculino y el femenino sino también por la interacción entre ambos (Stephenson, 1992; Hormaza y Herrero, 1994; Higashiyama et al., 2001, Hedly et al., 2005) y por factores ambientales (Hedhly et al., 2005; Mulcahy, 1979; Gillispie y Turelli, 1989). Entre las condiciones ambientales, la temperatura es uno de los factores que más afecta al proceso reproductivo (Hedhly et al., 2009).

En aguacate tiene lugar una importante competencia entre los tubos polínicos que crecen a lo largo del tejido transmisor del estilo, de tal forma que, sólo un tubo logra alcanzar el ovario y penetrar el óvulo. El crecimiento a través del estilo es rápido, tardando 2,5 horas en alcanzar la base, aunque, este proceso es altamente dependiente de la temperatura (Sedgley, 1977) así como de la cantidad de granos de polen depositados en el estigma (Papademetriou, 1975b; Sedgley, 1976; Tomer y Gottreich, 1975). Shoval (1987) encontró una correlación entre el número de granos de polen depositados en el estigma y el porcentaje de flores en las que el tubo polínico alcanza el óvulo. El número de tubos polínicos que compiten en el estilo y que al final logran alcanzar el ovario



es variable en función de los genotipos parentales (Robbertse, 1994; Robbertse, 1995) y éste número se ve afectado por la temperatura.

A lo largo del recorrido del tubo polínico son evidentes una serie de cambios en el estilo del aguacate, particularmente en las papilas estigmáticas y en las células del tejido transmisor. En ellas, se observa una pérdida casi total del contenido en almidón, empleado posiblemente como fuente energética para el crecimiento del tubo aunque, esta degradación del almidón también se ha descrito en pistilos no polinizados (Sedgley, 1979).

### **3.3.3. Llegada al ovario**

La tasa de crecimiento del tubo polínico no es constante; en el caso del melocotonero se ha demostrado que esta diferente tasa se debe a las estructuras pistilares (Herrero y Arbeloa, 1989). El pistilo y el óvulo han desarrollado una especie de puertas que encuentra el tubo polínico durante su crecimiento y tiene que atravesar hasta alcanzar finalmente el gametofito femenino. A lo largo de este camino se producen una serie de secreciones que suponen unos estímulos físicos y químicos para guiar al tubo polínico en su recorrido (Herrero, 2000; 2003).

En algunas especies como en el melocotonero (Arbeloa y Herrero, 1987; Herrero y Arbeloa, 1989) cuando el tubo polínico alcanza el ovario se encuentra con el obturador, una protuberancia de la placenta que actúa como un puente entre el estilo y el óvulo emitiendo una secreción que permite el paso del tubo polínico. Una vez que el tubo polínico ha pasado por el obturador, la callosa empieza a acumularse sobre esta estructura, hecho que confiere al obturador un papel crítico controlando la penetración del tubo polínico dentro del óvulo de tal forma que, el crecimiento del tubo polínico no puede ocurrir ni antes de que tenga lugar la secreción ni después de que degenera el obturador, por lo que puede tratarse de un mecanismo preventivo frente las infecciones.



En el caso del aguacate no se ha descrito la existencia de un obturador, aunque se ha puesto de manifiesto que el tubo polínico, cuando alcanza la base del estilo, detiene su crecimiento, hecho que se ha asociado a una posible inmadurez del saco embrionario y, por tanto, a la incapacidad de emitir señales necesarias para la atracción del tubo polínico (Sedgley, 1979).

En general, el crecimiento del tubo en el ovario es guiado por una señal procedente de la sinérgida de óvulos sin fecundar (Cheung y Wu, 2001; Higashiyama et al., 2001). En el ovario, el tubo recibe señales procedentes del funículo que permiten el crecimiento del tubo desde la placenta al funículo y posteriormente señales del micropilo que permite el crecimiento desde el funículo hacia el micropilo (Shimizu y Okada, 2000). Una vez que el tubo polínico alcanza el saco embrionario, entra en el aparato filiforme, detiene su crecimiento y el extremo del tubo se rompe liberándose las dos células espermáticas (Higashiyama et al., 2000). En *Arabidopsis* este proceso tiene lugar dos o tres minutos después de alcanzar la sinérgida (Roman et al., 2003). La importancia de la sinérgida en la atracción del tubo polínico parece ser una característica común de las angiospermas y se necesita de al menos una sinérgida para la atracción del tubo polínico (Higashiyama et al., 2001) con la excepción de *Plumbago zeylanica* (Russell, 1983) que carece de sinérgidas, aunque la célula huevo presenta una estructura similar y lleva a cabo la función de éstas. Experimentos *in vitro* ponen de manifiesto que la fusión de la célula espermática con la célula huevo ocurre en altas concentraciones de calcio (Faure et al., 1994) e *in vivo* la fusión de gametos es inducida por el incremento de la concentración de Ca secretado en las vacuolas durante la degeneración de las sinérgidas (Russell, 1992; Higashiyama, 2002). En los últimos años se han identificado un alto número de genes que se expresan en la sinérgidas (Steffen et al., 2007). Una vez que se liberan las dos células espermáticas, una de ellas se fusionará con la célula huevo para dar lugar al embrión mientras que la otra se fusionará con la célula central dando lugar al endospermo (Russell, 1992). El hecho de que tenga lugar una doble fertilización confiere a las Angiospermas una serie de ventajas



evolutivas debido a que el endospermo asegura el desarrollo del embrión (Friedman, 1995; Friedman y Williams, 2004).

Aunque normalmente la flor de aguacate presenta un saco embrionario, en ocasiones se han observado flores con dos sacos. En estos casos pueden observarse dos tubos creciendo en el ovario (Tomer et al., 1976). En aguacate, el tubo polínico alcanza el óvulo aproximadamente, en un periodo de entre 18 y 24 horas. El tubo crece rodeando al funículo y penetra el óvulo a través del micropilo (Segdley, 1979). En ocasiones, el tubo polínico detiene su crecimiento antes de alcanzar el saco embrionario (Tomer y Gotreich, 1979) y se requiere de 6 a 24 horas para que lo penetre. Esto puede deberse al hecho de que el saco embrionario no esté maduro en el momento en el que el tubo alcanza la base del estilo (Sedgley, 1979) o que sea necesario un tiempo para que el tubo polínico lleve a cabo la penetración del óvulo. Tras la entrada del tubo polínico, una de las sinérgidas degenera, mientras que otra persiste. Dos días después de la polinización, el núcleo espermático se encuentra próximo a la célula huevo y la otra espermátida cerca del núcleo polar ocurriendo primero la fusión del núcleo polar y la célula espermática y, posteriormente, la fusión de la otra espermátida con la ovocélula. El endospermo se divide rápidamente después de la fusión y la pared del endospermo se forma tras varias divisiones nucleares. La segunda división ocurre dos o tres días después de la polinización. En esta etapa se suceden numerosas divisiones del endospermo y, seis días después de la polinización, las sinérgidas degenerada y persistente aún permanecen. Tras 5 o 6 días después de la polinización tienen lugar las primeras divisiones del cigoto.

### **3.3.4. Maduración de las estructuras del pistilo**

Para asegurar una fecundación exitosa es imprescindible la receptividad sincronizada de todos los órganos y células implicados en la fase progámica. Un amplio número de trabajos han puesto de manifiesto que en distintas especies frutales en el momento de la antesis el saco embrionario aún no ha completado su desarrollo (Pimienta y Polito, 1983, Egea y Burgos, 2000, Burgos y Egea, 1993,



Rodrigo y Herrero, 1998; Albuquerque et al., 2002; Ruiz y Egea, 2008; Arbeloa y Herrero, 1991; Sedgley, 1979) siendo el óvulo la última estructura que alcanza la madurez (Herrero, 1992). Todos estos mecanismos han de tenerse en cuenta para llevar a cabo un estudio exhaustivo del EPP (Effective Pollination Period, Periodo Efectivo de Polinización). La maduración del pistilo implica la producción de una serie de exudados que permiten el paso del tubo polínico; una vez que los tubos polínicos han atravesado las distintas estructuras pistilares, acontece la degeneración celular, regulándose de esta forma su paso y evitando procesos infecciosos. Los procesos de polinización activan una serie de vías citoplasmáticas y bioquímicas capaces de inducir actividad en distintos tejidos, y se pone de manifiesto por cambios en los niveles de RNA, síntesis de proteínas, almidón y cambios en la tasa de respiración. Algunas secreciones son independientes de la polinización como, por ejemplo, la secreción que tiene lugar en el obturador que abre el paso hacia el óvulo en melocotonero (Arbeloa y Herrero, 1987), mientras que otros son dependientes, como es el caso de la degeneración y maduración del saco embrionario tanto en albaricoquero (Burgos y Egea, 1993) como en almendro (Pimienta y Polito, 1983).

En el aguacate, se ha observado que los granos de polen depositado en estigmas de flores en estado masculino son capaces de germinar, aunque los tubos polínicos detienen su crecimiento en el estilo y no alcanzan el óvulo (Sedgley, 1977a; Shoval, 1987). No obstante, bajo las condiciones climáticas de Florida (cálidas y húmedas), los tubos polínicos sí que pueden alcanzar el óvulo y llevar a cabo la fecundación (Davenport et al., 1994; Imbert, 1997) y el desarrollo inicial del fruto (Papademetriou, 1976).

### **3.4. Abscisión de flores y frutos**

En aguacate, el número de frutos que se observan una vez que finaliza la floración es muy superior al número de frutos que alcanzan la madurez, lo cual se debe a una abscisión masiva de frutos que acontece en los meses de verano, principalmente durante los dos posteriores a la etapa de floración (Lahav y



Zamet, 1999). La mayoría de flores que caen el mes siguiente a la antesis son flores no fecundadas (Sedgley, 1987), lo cual sugiere una polinización inadecuada o falta de fecundación. En el caso del cultivar de mayor interés a nivel mundial, 'Hass', la abscisión es masiva, obteniéndose del orden de 100 a 200 frutos maduros a partir de más de un millón de flores (Lahav y Zamet, 1999).

La abscisión tanto de flores como de pequeños frutos está afectada por las condiciones ambientales y se ve afectada por el viento, por la temperatura y por la humedad relativa (Lahav y Zamet, 1999). Cuando el fruto es de pequeño tamaño, el tejido embrionario se daña fácilmente por condiciones ambientales desfavorables que llevará consigo o bien que el fruto caiga o que se desarrolle sin semilla (Schroeder, 1954). La caída de pequeños frutos se ha descrito como selectiva, lo cual implica que la posesión de un determinado genotipo en el embrión conferiría ventajas en la supervivencia de unos frutos frente a otros (Degani et al., 1997, Guil y Gazit, 1992). Esta caída selectiva de frutos se ha descrito en distintos cultivares de aguacate. Así, frutos resultantes de fecundación cruzada parecen que se mantienen en el árbol durante más tiempo que aquellos autofecundados (Degani et al., 1997; Robbertse et al., 1997; Degani et al., 2003). De este modo, el genotipo del donador de polen jugaría un papel de gran importancia, aumentando la supervivencia de su progenie (Degani et al., 1986). Esta caída selectiva se ha descrito en otros frutales como el litchi (*Litchi chinensis* Sonn) (Degani et al., 1995). En el caso de que los frutos que primero caen sean aquellos procedentes de autopolinización, favorecer la fecundación cruzada contribuiría a mejorar la retención de fruta, incrementándose de este modo la productividad.

La abscisión selectiva de frutos puede verse afectada por factores tales como selección genética, sensibilidad a las condiciones ambientales y la habilidad para competir con el crecimiento vegetativo y con los frutos vecinos por las reservas nutritivas (Degani et al., 1989). Por otra parte, hay que tener presente que la limitación de recursos lleva consigo la abscisión de gran cantidad



de frutos por competencia entre los distintos sumideros en la planta (Lloyd, 1980; Stephenson, 1981).

#### **4. Efecto de la temperatura en la fase reproductiva**

La reproducción es uno de los procesos dentro del desarrollo de las plantas más vulnerables a la temperatura (Hedhly et al., 2009) puesto que afecta a pasos relevantes como son la receptividad estigmática (Burgos et al., 1991; Egea et al., 1991; Kumar et al., 1995; Hedly et al., 2003), la germinación y el crecimiento del tubo polínico (Lewis, 1942; Williams, 1970; Elgersma et al., 1989), la longevidad del óvulo (Tompson y Liu, 1973; Stösser y Anvari, 1982; Postweiler et al., 1985) y el cuajado (Jackson y Hamer, 1980; Mellenthin et al., 1972; Vasilakakais y Porlingis, 1985; Cuevas et al., 1994). Además, se ha descrito una alta variabilidad genética en cuanto al comportamiento del polen dependiendo de las condiciones de temperatura entre especies (Zamir et al., 1981; Weinbaum et al., 1984; Patterson et al., 1987; McKee y Richard, 1998) y entre genotipos de la misma especie tanto en cuanto a la germinación del polen (Weinbaum et al., 1984; Polito et al., 1988; Loupassaki et al., 1997; Srinivasan et al., 1999; Lankinen, 2001) como al crecimiento del tubo polínico (Gawel y Robacker, 1986; Srinivasan et al., 1999; Pasonen et al., 1999; Sukhvibul et al., 2000).

Del mismo modo, las condiciones climáticas durante la floración tienen efectos acumulativos sobre el desarrollo de la flor que pueden afectar a la duración y al comienzo de la floración así como al periodo efectivo de polinización y a los vectores de polinización (Sedgley y Griffin, 1989).

##### **4.1. Efecto sobre el ciclo floral en aguacate**

La temperatura juega un importante papel en el patrón de comportamiento floral en aguacate. Así, en el caso de cultivares de tipo A cuando las temperaturas nocturnas no son inferiores a 12°C y en el caso de cultivares de tipo B cuando las máximas diurnas no superan los 22°C /26°C (Lesley y Bringham, 1951) el ciclo



floral sigue un comportamiento normal. Los cultivares de tipo B muestran una mayor sensibilidad a las bajas temperaturas que los cultivares de tipo A (Lesley y Bringhursts, 1951; Sedgley, 1977b; Sedgley y Annells, 1981; Sedgley y Grant, 1983) de tal forma que los cultivares de tipo B presentan una temperatura de floración óptima de 25°C durante el día y de 10°C de noche, mientras que la temperaturas óptimas para cultivares de tipo A son de 20°C diurna y de 10°C nocturna. Cuando las temperaturas diurnas son inferiores a 17°C se observa una reducción en la proporción de flores que abren en estado femenino.

Bajo temperaturas nocturnas inferiores a las óptimas se observa un retraso en la apertura de la flor (Stout, 1933; Peterson, 1956) pudiendo incluso originar un cambio en el comportamiento entre los grupos florales A y B (Stout, 1927; Bergh, 1986). En etapas de floración en las que las temperaturas son bajas, puede incluso tener lugar la omisión de la apertura en el estadio femenino (Sedgley, 1977; Sedgley y Annells, 1981; Sedgley y Grant, 1983). Además, durante etapas de floración frías, se incrementa el solape entre estadios sexuales (Bergh, 1969; Sedgley y Grant, 1983) favoreciendo la autopolinización, aunque el efecto de la temperatura va a depender de la variedad y del grupo floral al que pertenezca. Por otra parte, el descenso de la temperatura afecta a la actividad de las abejas y, por tanto, disminuye el porcentaje de estigmas con polen o la cantidad de polen por estigma (Robison y Savage, 1926; Peterson, 1955; Free y Willians, 1976).

#### **4.2 Efecto sobre el gametofito masculino**

La temperatura también afecta al comportamiento del gametofito masculino. Existe un rango de temperatura óptimo para la germinación del polen en aguacate (Sedgley y Annells, 1981). La temperatura afecta a la germinación del polen tanto *in vitro* (Kuo et al., 1981; Vasilakakis y Porlingis, 1985; Stern y Gazit, 1998) como *in vivo* (Aneja et al., 1992) aunque la temperatura óptima es variable en función de la especie y la variedad.



La tasa de crecimiento del tubo polínico es también altamente dependiente de la temperatura (Segdley, 1977); así, a bajas temperaturas el crecimiento del tubo polínico es más lento mientras que las altas temperaturas aceleran el crecimiento de los tubos tanto en especies herbáceas (Lewi, 1942; Elgersma et al., 1989) como en frutales (Socias i Company et al., 1976; Lombard et al., 1972, Austin et al., 1998; Hedly et al., 2004). En aguacate, la viabilidad del polen se mantiene cuando éste se conserva a bajas temperaturas (0-5°C), mientras que temperaturas por encima de los 30°C disminuyen la capacidad del tubo polínico para alcanzar el saco embrionario (Gafni, 1984). Al igual que la viabilidad del grano de polen, los procesos de fecundación y cuajado se ven afectados negativamente por las altas temperaturas, en todas las variedades, aunque la susceptibilidad es variable dependiendo del cultivar.

### **4.3. Efecto sobre el gametofito femenino**

El cuajado se ve afectado por las temperaturas existentes durante la floración puesto que los cambios de temperatura afectan al periodo efectivo de polinización. En diversos trabajos en distintas especies frutales se ha puesto de manifiesto que la temperatura puede afectar a diferentes estados de los procesos reproductivos, entre ellos la receptividad estigmática (Burgos et al., 1991; Egea et al., 1991; Kumar et al., 1995; Hedly et al., 2003). Cuando aumenta la temperatura, la cantidad de polen que se adhiere al estigma puede ser mayor que la observada en condiciones normales debido a que el ascenso de temperatura acelera la maduración estigmática y, de este modo, la secreción se ve incrementada favoreciendo la retención de granos de polen. En el caso de peral (Sanzol et al., 2003) y cerezo (Hedly et al., 2003) se ha puesto de manifiesto una regulación independiente de los procesos de adhesión y germinación de los granos de polen.

Por otra parte, la longevidad de los óvulos es un factor que juega un papel decisivo en el periodo efectivo de polinización (Williams, 1965) puesto que los óvulos son estructuras de corta viabilidad (Stösser y Anvar, 1982, 1983;



Tompson y Liu, 1973). En diferentes especies se han descrito que las altas temperaturas reducen el periodo de viabilidad del óvulo (Postweiller et al., 1985; Moreno et al., 1992; Cerovic y Ruzic, 1992, Cerović et al., 2000, Hedly et al., 2003).

#### **4.4. Efecto sobre la fecundación y el cuajado**

En aguacate, el crecimiento del tubo polínico y la penetración del saco embrionario se ven afectados por altas temperaturas de tal forma que, aunque el crecimiento del tubo es más rápido, no penetra el saco embrionario. En condiciones de bajas temperaturas, el crecimiento del tubo se ralentiza y la penetración del saco embrionario tiene lugar 3 o 4 días después de la polinización. El hecho de que la temperatura afecte a la dinámica del tubo polínico e implique diferencias en el comportamiento de éstos lleva a pensar en la temperatura durante el proceso reproductivo como un agente de selección natural que selecciona los genotipos mejores adaptados a dichas condiciones.

Además, la caída prematura de frutos se ve afectada por la temperatura, oscilando la óptima para el amarre del fruto entre 20 y 25°C, mientras que temperaturas superiores a 28°C provocan un incremento de la abscisión.

#### **5. Reservas nutritivas**

En las plantas leñosas los carbohidratos representan aproximadamente tres cuartas partes de su peso seco y juegan un importante papel en el metabolismo así como en procesos de crecimiento, defensa, resistencia al frío y a otros factores ambientales (Lovatt, 1993). En las plantas leñosas, no existe un órgano específico de almacenamiento (Kandiah, 1979) por lo que todas las partes almacenan reservas en mayor o menor grado. El almidón es uno de los principales componentes de las reservas de las plantas leñosas (Chapin et al, 1990) y está involucrado en procesos tan importantes como el desarrollo vegetativo y los procesos reproductivos (Charlesworth, 1989), compitiendo



ambos procesos por las reservas nutritivas (Wardlaw, 1990). Tradicionalmente se ha asumido que las reservas nutritivas del árbol juegan un papel decisivo en el nivel de fructificación puesto que el desarrollo reproductivo supone una gran demanda energética desde los procesos de inducción floral hasta que el fruto alcanza su estado de madurez. Así, en algunas plantas, como *Rubus chamaemorus*, se ha puesto de manifiesto que la producción final se ve influenciada por las reservas de carbohidratos (Jean y Lapointe, 2001). Además, se ha establecido una estrecha correlación entre la disponibilidad de carbohidratos y la caída de flores y frutos (Ruiz et al., 2001). Las reservas de almidón se encuentran ampliamente compartimentadas (Watson y Casper, 1984) incluso dentro de los tejidos del pistilo (Arbeloa y Herrero, 1991) y esta compartimentación juega un papel clave en los procesos reproductivos (Herrero, 1992; Herrero y Hormaza, 1996). Así, se ha puesto de manifiesto la implicación del almidón presente en el óvulo en el desarrollo de sus estructuras (Arbeloa y Herrero 1991) del mismo modo que el almidón presente en los estilos permite el crecimiento del tubo polínico a lo largo del mismo (Herrero y Dickinson, 1979) y el contenido en los integumentos se utiliza para el crecimiento de ovario que acontece tras la fecundación (Rodrigo y Herrero, 1998). El término calidad de flor se ha empleado frecuentemente para explicar diferencias de cuajado (Williams, 1965; Goldwin, 1981), aunque se desconoce qué es y qué la determina. El hecho de que el inicio de la fructificación (Rodrigo et al., 2000) dependa de las reservas de almidón previamente acumuladas en la flor unido a que el primer síntoma que se observa en la degeneración de los óvulos sea la desaparición de las reservas de almidón (Rodrigo y Herrero, 1998) sugiere que las reservas acumuladas en la flor en el momento de la antesis podrían jugar un papel decisivo en el cuajado. Este hecho, unido a la existencia de claras diferencias en el contenido de almidón entre flores de un mismo genotipo en el momento de antesis, claramente refuerza la idea de que las reservas nutritivas de la flor juegan un papel decisivo en el proceso reproductivo, siendo las responsables, al menos en parte, de la calidad de flor. La importancia de las reservas nutritivas en el destino de una determinada flor se ha puesto de



manifiesto con la observación de diferencias en el contenido de almidón entre flores de distinto genotipo que muestran diferencias en su caída bajo situaciones de estrés (Lebon et al., 2004). En el caso del albaricoquero se han observado diferencias en el contenido de almidón entre distintas flores (Rodrigo et al., 2000), lo que explicaría, en gran medida, los cuajados erráticos en este frutal (Rodrigo et al., en prensa). Por otra parte se ha sugerido que la competencia entre flores y hojas que aún no tienen capacidad fotosintética condiciona la retención de frutos (Aloni et al., 1991).

Hasta hace unos años los métodos de los que se disponían para determinar el contenido de almidón eran métodos extractivos y técnicas bioquímicas que no aportaban información alguna acerca de la compartimentación del almidón. Uno de los métodos más eficaces para el estudio de la localización del almidón en determinados tejidos junto a su cuantificación fue desarrollado por Rodrigo et al. (1997). Este método combina técnicas histoquímicas con análisis de imagen siendo de gran utilidad para llevar a cabo un estudio exhaustivo de la calidad de la flor.

Actualmente los estudios que buscan una estrecha correlación entre el éxito reproductivo de una flor y sus reservas nutritivas son escasos e inexistentes en aguacate por lo que va a ser un tema de análisis en este trabajo con el fin de evaluar su importancia en el bajísimo porcentaje de cuajado.

## OBJETIVOS

El objetivo fundamental de este trabajo es el estudio de la biología reproductiva del aguacate (*Persea americana* Mill.) con la finalidad de determinar los factores limitantes en la producción de aguacate ‘Hass’. Este objetivo general se divide en 3 objetivos:

### **Objetivo 1.** *Fase progámica.*

Evaluación de la fase progámica, caracterizando el efecto de la temperatura sobre el comportamiento del polen tanto *in vivo* como *in vitro*, así como sobre el pistilo.

### **Objetivo 2.** *Consecuencias en el cuajado.*

Establecimiento del efecto de la polinización en el patrón de caída de flores y frutos y caracterización de las implicaciones de las reservas nutritivas de la flor en su éxito reproductivo.

### **Objetivo 3.** *Implicaciones agronómicas*

Evaluación del efecto de la plantación de cultivares complementarios en la producción y búsqueda de polinizadores alternativos.

Estos objetivos se desarrollan a lo largo de 7 capítulos. Para el desarrollo del primer objetivo nos centramos en el estudio de la fase reproductiva, analizando el efecto de la temperatura sobre el gametofito masculino (Capítulo 1) y sobre la fase progámica (Capítulo 2). En el segundo objetivo se analiza el efecto de la polinización en el patrón de caída de flores y frutos y en el cuajado final (Capítulo 3). Además, se evalúa el estado nutritivo de la flor y sus implicaciones en el cuajado (Capítulo 4). En el tercer objetivo se analizan las implicaciones agronómicas de la biología reproductiva del aguacate. En primer



## Objetivos

lugar se realiza una identificación molecular de diferentes genotipos (Capítulo 5) para, posteriormente, evaluar el sistema de reproducción predominante en nuestra zona de cultivo. Del mismo modo se analiza el efecto de la plantación de cultivares complementarios en la producción así como la determinación de si ocurre una caída selectiva de frutos en base a su genotipo (Capítulo 6). Por último, con la finalidad de seleccionar potenciales polinizadores para ‘Hass’, se determina la etapa de floración de distintos genotipos así como el comportamiento floral en nuestra zona de estudio (Capítulo 7).



**Parte I**  
**Fase Progámica**





# 1 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA GERMINACIÓN *IN VITRO* DE POLEN DE AGUACATE

## INTRODUCCIÓN

Una vez que los granos de polen son depositados sobre el estigma comienza el proceso de competición en el que solamente aquellos tubos más rápidos alcanzarán el óvulo (Mulcahy, 1979; Hormaza y Herrero, 1992; 1994). Teniendo en cuenta el efecto de la temperatura durante esta etapa, bajo determinadas condiciones de temperatura algunos genotipos podrán verse favorecidos causando una desviación en la composición genética esperada en la descendencia en función de las condiciones que prevalezcan durante la fase reproductiva (Mulcahy, 1979; Gillispie y Turelli, 1989; Hedhly et al., 2005). En numerosos trabajos se ha puesto de manifiesto la existencia de una estrecha relación entre la tasa de crecimiento del tubo polínico y la temperatura (Sedgley, 1977; Sedgley y Buttrose, 1978; Jeffries y Brain, 1984, Elgersma et al., 1989). En aguacate (Sedgley y Annels, 1981; Sedgley y Grant, 1983) como en otras especies tropicales (Young, 1955; Robbertse et al., 1988) se ha descrito que bajas temperaturas llevan consigo una ralentización del crecimiento del tubo polínico. Por ello, la tasa de crecimiento del tubo polínico se convierte en un factor decisivo en el control de la composición genética de las semillas (Pasonen et al., 1999) y en la fijación de determinados alelos en la descendencia que confieren ventajas en cuanto a la tasa de crecimiento de los tubos polínicos.

Puesto que diferencias entre genotipos en la germinación y crecimiento del tubo polínico conducen a diferencias en el éxito reproductivo, el conocimiento del estado de competición bajo las condiciones ambientales predominantes durante la etapa de floración resulta fundamental para optimizar la producción en plantaciones comerciales, especialmente con las perspectivas actuales de calentamiento global (Hedhly et al., 2009). La temperatura global ha experimentado un ascenso de 0,6°C desde el siglo XIX y se prevé un incremento



## Capítulo 1

que oscila entre 1,4 y 5,8°C a finales del siglo XXI (Houghton et al., 2001; IPCC, 2007), aunque las previsiones son variables dependiendo de las zonas.

En aguacate, tradicionalmente se han descrito tres razas o variedades botánicas adaptadas a diferentes condiciones ecoclimáticas: Mejicana, Guatemalteca y Antillana; siendo la raza mejicana la más tolerante al frío y la antillana la más susceptible. Disponer de información referente al efecto de la temperatura en la germinación del polen y en el crecimiento del tubo polínico podría explicar el efecto de la temperatura en el cuajado y optimizar la elección de genotipos. Puesto que la germinación y la fecundación *in vivo* son el resultado de la interacción entre el gametofito masculino y los tejidos femeninos del pistilo (Hormaza y Herrero, 1996), para estudiar el efecto de la temperatura únicamente sobre el comportamiento del polen, en este trabajo se realizan los ensayos *in vitro* cuantificando el efecto de la temperatura en la germinación, en la cinética y dinámica del tubo polínico en genotipos de las diferentes variedades botánicas de aguacate.

La viabilidad del polen se puede estimar usando diferentes métodos. El método más eficiente consiste en analizar el porcentaje de cuajado obtenido tras polinizar con los genotipos de estudio. Sin embargo, en el caso del aguacate, debido a la baja tasa de cuajado que presenta, resulta más factible el uso de otros métodos. La germinación *in vitro* se considera como el mejor método para el estudio de la viabilidad del polen (Shivanna et al., 1991) debido a su simplicidad y a que permite cuantificarla (Shivanna y Johri, 1985), aunque presenta una serie de desventajas entre las que destacan la carencia de correlación con el cuajado y con los resultados obtenidos en estudios de germinación *in vivo* y la necesidad de disponer de un método de germinación adecuado. El test de germinación *in vitro* ha sido ampliamente usado en plantas herbáceas y leñosas (Tuinstra y Wedel, 2000), en frutales (Calzoni et al., 1979) y en frutales subtropicales tanto de polen binucleado, como el mango (Sukhvibul et al., 2000), y trinucleado, como el chirimoyo (Rosell et al., 1999; Lora et al., 2005). De esta forma, este método



permite estudiar el efecto de la temperatura sin la posible interferencia del genotipo materno.

Debido a que con el empleo del método de germinación previamente descrito en aguacate (Sahar y Spiegel, 1984; Loupassaki et al., 1997), en el que se habían obtenido porcentajes de germinación que oscilaban desde el 14% al 44% en función del cultivar, observamos que la mayor parte de los granos de polen que empezaban a germinar estallaban, fue necesario, como primer paso, optimizar el medio de germinación para la consecución de los objetivos que nos habíamos planteado en este trabajo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Optimización del medio de germinación *in vitro***

#### *Material vegetal*

Para la puesta a punto de un método apropiado de germinación *in vitro* se empleó polen procedente del cultivar ‘Hass’. Las flores se recogieron en estado masculino después de la dehiscencia de las anteras, aproximadamente a las 17:30. Estas flores se mantuvieron durante dos horas en una atmósfera al 100% de humedad relativa (Loupassaki et al., 1997).

#### *Ensayo de germinación*

Para la puesta a punto de un método de germinación adecuado se diseñaron una serie de experimentos evaluando el efecto de la sacarosa, Polietilenglicol (inerte metabólicamente), Magnesio (en forma de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) y Calcio [en forma de  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ] en la germinación del polen. Los experimentos se realizaron en placas de Petri utilizando un medio base que contenía 100 mg/l de  $KNO_3$  y 100 mg/l de  $H_3BO_3$ .



Inicialmente se evaluó el efecto de la sacarosa a seis concentraciones: 0, 5, 10, 15, 20 y 30 % y el PEG 8000 a 10, 15, 20, 25 y 30% (tabla 1).

Posteriormente se probaron tres concentraciones distintas de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ : 200, 240 y 300 mg/l y cuatro concentraciones de  $Ca(NO_3)_4 \cdot H_2O$ : 240, 480, 720 y 960 mg/l en un medio que contenía un 10% sacarosa y un 23% PEG. La composición de los medios empleados se detalla en la tabla 2.

Para este trabajo, se espolvoreó el polen de 20 flores en una placa de Petri de 35 mm que contenía 2 ml de medio líquido y se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 horas. La germinación de polen se cuantificó en un microscopio óptico Leica DML considerándose como granos de polen germinados aquellos que presentan tubos polínicos cuya longitud superaba el diámetro del grano. Se emplearon tres placas por tratamiento y en cada placa se contaron al menos 200 granos de polen. En cada medio se determinó el número total de granos germinados y estallados. Los datos de porcentajes se transformaron mediante la raíz cuadrada del arcoseno para un análisis de varianza (ANOVA) y para la separación de las medias se empleó el test de Duncan (5%). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el programa SPSS 15.0.

**Tabla 1.** Medios utilizados para comparar el efecto de la variación en sacarosa y PEG en una misma concentración de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  y  $Ca(NO_3)_4 \cdot H_2O$ .

MEDIO	PEG (%)	SACAROSA (%)
Asac	17	10
Bsac	17	15
Csac	17	20
Dsac	20	10
Esac	20	15
Fsac	20	20
Gsac	23	10
Hsac	23	15
Isac	23	20

**Tabla 2.** Medios utilizados para comparar el efecto de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  y  $Ca(NO_3)_4 \cdot 4H_2O$  manteniendo constante la concentración de sacarosa y de PEG. La concentración de los distintos componentes aparece en mg/l.

MEDIO	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	$Ca(NO_3)_4 \cdot 4H_2O$
Asal	200	240
Bsal	200	480
Csal	200	720
Dsal	200	960
Esal	240	240
Fsal	240	480
Gsal	240	720
Hsal	240	960
Isal	300	240
Jsal	300	480
Ksal	300	720
Lsal	300	960

## Efecto de la temperatura sobre la germinación y el crecimiento del tubo polínico *in vitro*

### *Material vegetal*

Se eligieron genotipos de aguacate de diferente origen racial conservados en la Estación Experimental la Mayora: ‘Hass’, ‘Fuerte’, ‘Anaheim’, ‘Topa Topa’, ‘Maoz’ y ‘Gvar 13’. Así, ‘Fuerte’ (Ashworth y Clegg, 2003), y ‘Hass’ (Schnell et al., 2003) son híbridos GxM con diferente nivel de herencia mejicana; ‘Topa Topa’ (Ashworth y Clegg, 20003; Schnell et al., 2003) y ‘Gvar 13’ (Kadman y Ben-Ya’acov, 1980b) son de raza Mejicana, ‘Anaheim’ es Guatemalteco (Schnell et al., 2003) y ‘Maoz’ es Antillano (Kadman y Ben-Ya’acov, 1981). Los distintos genotipos no coinciden en la etapa de floración en nuestras condiciones de cultivo; así mientras que ‘Fuerte’ y ‘Topa Topa’ son los más tempranos (‘Topa Topa’ florece al final de febrero y ‘Fuerte’ durante el mes de marzo) el resto de los genotipos florecen durante el mes de abril.

En el caso de los cultivares ‘Hass’ y ‘Fuerte’, el estudio se llevó a cabo durante dos años consecutivos, por tratarse de los de mayor interés económico en



España, siendo ‘Fuerte’ el cultivar más frecuentemente empleado como polinizador en nuestra zona de cultivo; en el resto de los cultivares los estudios se llevaron a cabo durante un año.

### *Germinación de polen in vitro*

El polen de los distintos genotipos se obtuvo a partir de las flores recogidas en el momento en el que tuvo lugar la dehiscencia de las anteras, es decir, entre las 12:00 y 13:00 en el caso de los cultivares de tipo B y entre las 16:00 y 17:30 en los cultivares de tipo A. En la tabla 3 se muestra el grupo floral de los distintos genotipos empleados en este ensayo.

**Tabla 3.** Raza y grupo floral de los genotipos empleados en este estudio.

<b>Genotipos</b>	<b>Raza</b>	<b>Grupo floral</b>
<b>Anaheim</b>	G <sup>1</sup>	A
<b>Fuerte</b>	MxG <sup>2</sup>	B
<b>Gvar 13</b>	M <sup>3</sup>	A
<b>Hass</b>	MxG <sup>1</sup>	A
<b>Maoz</b>	A <sup>4</sup>	B
<b>Topa Topa</b>	M <sup>1,2</sup>	A

<sup>1</sup>Schnell et al., 2003

<sup>2</sup>Ashworth y Clegg, 2003

<sup>3</sup>Kadman y Ben-Ya'avov, 1980b

<sup>4</sup>Kadman y Ben-Ya'avov, 1981

Para la germinación *in vitro*, las anteras fueron expuestas a una atmósfera de alta humedad relativa durante dos horas (Loupassaki et al., 1997); posteriormente, se colocó el polen de 20 flores en una placa Petri de 35 mm de diámetro que contenía 2 ml de un medio líquido de germinación y se mantuvo a distintas temperaturas. El medio de germinación se obtuvo modificando el protocolo de Sahar y Spiegel-Roy (1984) como se describe en el apartado anterior y se componía de 23% PEG, 10% de sacarosa y una mezcla de sales minerales [100 mg/l KNO<sub>3</sub>, 100 mg/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 300 mg/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 480 mg/l Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O]. Tras 24 horas se evaluó el porcentaje de germinación y se



contaron un mínimo de 200 granos de polen por placa. Se visualizaron un mínimo de 20 placas por genotipo y temperatura y cada placa fue considerada como una repetición en el análisis estadístico. El recuento de polen se hizo diferenciando granos de polen germinados y no germinados, considerándose como germinados a aquellos cuyos tubos polínicos medían al menos el doble de su diámetro.

La germinación de polen se evaluó bajo tres condiciones de temperatura: 20°C, 25°C y 30°C.

#### *Longitud de los tubos polínicos in vitro*

Para estimar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de los tubos polínicos de cada genotipo se midió la longitud de los tubos polínicos tras 24 horas de germinación usando un ocular micrométrico acoplado al microscopio óptico. Las mediciones se hicieron en al menos 20 tubos al azar en cada una de las placas.

#### **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el programa SPSS 15.0. Los datos porcentuales se transformaron mediante la función angular para comparar las medias mediante un ANOVA. El test de Duncan (Duncan, 1955) se usó para la separación de las medias en los casos en los que se encontraron diferencias.



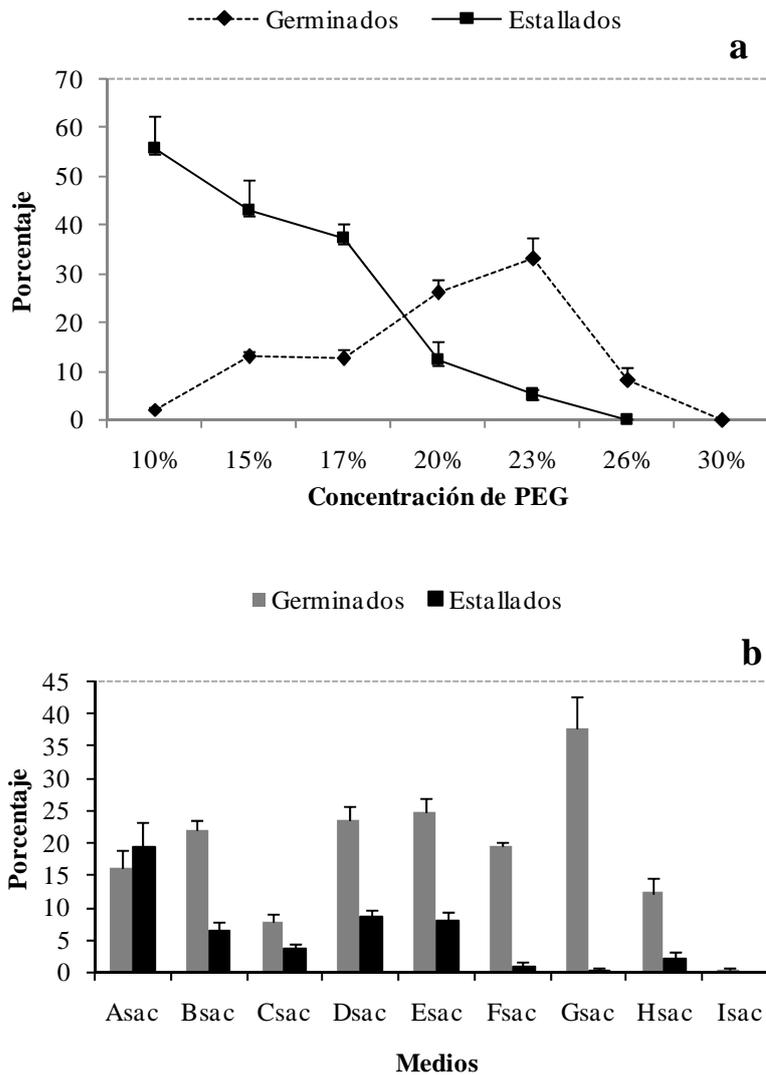
## RESULTADOS

### Optimización del medio de germinación del polen *in vitro*

#### *Germinación de polen con sacarosa y PEG*

Para optimizar el medio en el que se añade PEG, que juega un papel osmorregulador, y la sacarosa, cuya importancia es nutritiva, se determinó el porcentaje de germinación y de granos de polen que estallan empleando diferentes concentraciones. El análisis de varianza mostró diferencias significativas en función de la concentración de sacarosa tanto en la germinación del polen como en el porcentaje de granos de polen que estallan. En aquellos medios que no contenían sacarosa y en aquellos en los que la concentración era del 30% el porcentaje de germinación fue muy bajo e incluso nulo. Por otra parte, en los medios carentes de PEG el porcentaje de germinación oscilaba desde 0 al 10% mientras que el porcentaje de granos que estallaba era muy alto, con un valor medio del 55%. En medios que presentaban una concentración de sacarosa del 10% se observó que, usando concentraciones de PEG comprendidas entre 20 y 25%, se incrementaba el porcentaje de germinación y disminuía considerablemente la proporción de granos de polen estallados (Figura 1a).

Los resultados de la combinación de ambos componentes se muestran en la Figura 1b y se observa que la máxima germinación se obtuvo cuando el medio se componía del 10% sacarosa y del 23% PEG ( $p=0,01$ ). En las distintas concentraciones de PEG probadas, el porcentaje de germinación más bajo se observó siempre para concentraciones de sacarosa del 20%.



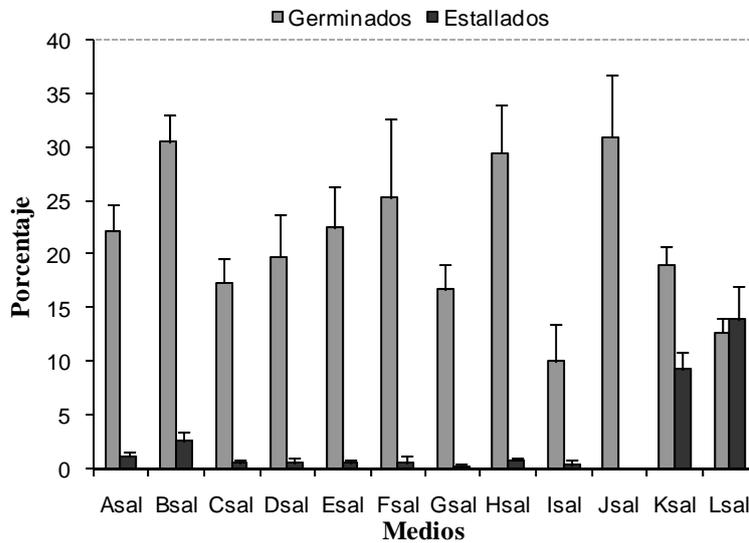
**Figura 1.** (a) Porcentaje de germinación usando una concentración del 10% de sacarosa y diferentes concentraciones de PEG. (b) Efecto de la combinación de las concentraciones del PEG y sacarosa en el porcentaje de germinación y de granos estallados. Las barras representan el error estándar.

### *Efecto del calcio*

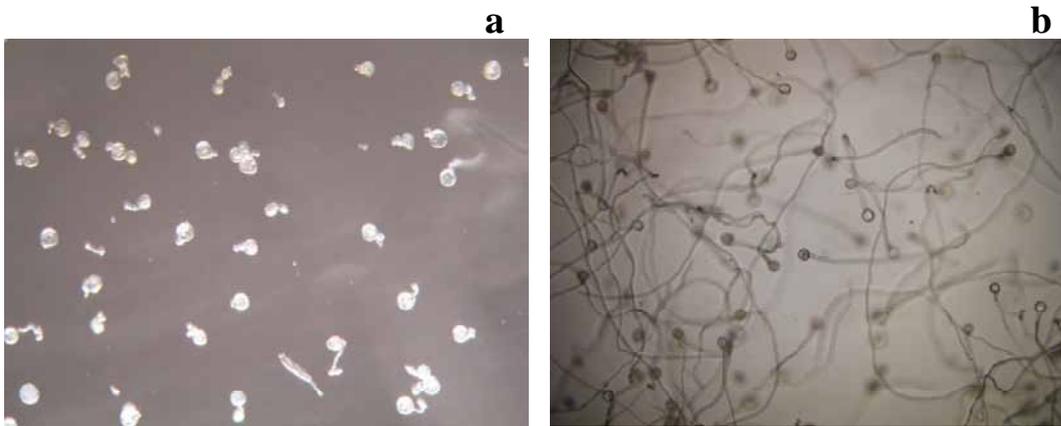
Se encontraron diferencias en el porcentaje de germinación asociadas a la combinación de sales de calcio y magnesio empleadas. Los resultados se muestran en la Figura 2. El porcentaje de germinación osciló desde el 10% (medio Isal) al 33% (medio Bsac). Los medios con mayor porcentaje de germinación fueron los medios Bsac, Hsac y Jsac no existiendo diferencias significativas entre ellos, aunque sí con respecto al resto de los medios empleados. El porcentaje de granos de polen estallados osciló desde 0 (Jsac) a



14% (Lsal). No se encontraron diferencias entre los medios en los que se obtenía la máxima germinación, aunque se consideró como medio óptimo aquel en el que, además de obtener el mayor porcentaje de germinación de polen, se obtuvo el mínimo de granos estallados que es el medio J (Figura 3b).



**Figura 2.** Porcentaje de germinación obtenido en diferentes medios combinando diferentes concentraciones de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  y de  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ . Las barras representan el error estándar.



**Figura 3.** (a) Germinación in vitro de polen usando el medio descrito previamente en aguacate (Sahar y Spiegel, 1984; Loupassaki et al., 1997). (b) Germinación in vitro usando el medio optimizado en este trabajo. Fotografías tomadas a las 24 horas de la siembra.



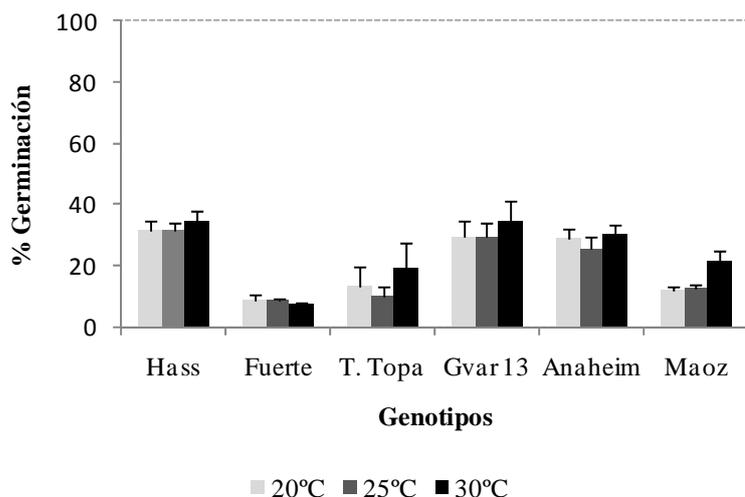
## Efecto de la temperatura en la germinación *in vitro*

### *Germinación de polen in vitro*

Una vez desarrollado un método optimizado para la germinación de polen *in vitro*, se pudo llevar a cabo el análisis del efecto de la temperatura sobre la germinación de polen. Para ello se estudiaron tres temperaturas constantes en la germinación *in vitro* de polen de seis genotipos de aguacate de diferente origen racial.

Tras realizar un análisis de varianza (ANOVA) se puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas en la germinación entre los distintos genotipos estudiados ( $p < 0,05$ ). En los distintos tratamientos de temperatura el máximo porcentaje de germinación fue siempre para el genotipo 'Gvar 13'. El porcentaje medio de germinación osciló desde 7,09% en el caso de 'Fuerte' a 34,93% para 'Gvar 13'.

A 20°C el porcentaje de germinación osciló desde 2,87% en 'Topa Topa' a 56,16% en 'Gvar 13'. A 25°C osciló entre 1,75% en 'Topa Topa' a 56,93 % en 'Gvar 13' y a 30°C el porcentaje osciló desde 3,51% en 'Fuerte' a 60,98 % en 'Gvar 13'. En los tratamientos a 20 y 25°C fue posible el establecimiento de dos grupos claramente diferenciados en función de su germinación. Así, el primero incluye a los genotipos 'Topa Topa', 'Maoz' y 'Fuerte' que mostraron el menor porcentaje de germinación y en el segundo se engloban los genotipos 'Gvar 13', 'Hass' y 'Anaheim'. Sin embargo, a 30°C, se observó que 'Fuerte' presentaba un porcentaje de germinación inferior al resto de los genotipos, que mostraron un porcentaje de germinación que varió desde 19,7% de 'Topa Topa' al 34,93% obtenido en 'Gvar 13' (Figura 4).



**Figura 4.** Porcentaje de germinación del polen *in vitro* de diferentes genotipos bajo diferentes temperaturas. Las barras representan el error estándar.

En este ensayo no se encontraron diferencias significativas al incrementar la temperatura en cada uno de los genotipos, excepto en el genotipo ‘Maoz’ que mostró un incremento en su germinación conforme aumentamos la temperatura (Figura 4). En todos los casos, el porcentaje de germinación más alto se obtuvo a 30°C, excepto en ‘Fuerte’ el cual experimentó un descenso en su porcentaje de germinación conforme aumenta la temperatura, aunque dicho descenso no fue significativo ( $p > 0,05$ ).

Por otra parte, se observaron diferencias significativas en los resultados obtenidos durante los dos años de estudio en el caso de los genotipos ‘Hass’ y ‘Fuerte’, de tal forma que ambos presentaron un mayor porcentaje de germinación en el año 2007 que en el 2006 (tabla 5), coincidiendo el primero de ellos con un año de alta producción (ON). Además en el caso de ambos cultivares, el porcentaje de germinación presentó diferencias significativas en función de si el polen procedía de las anteras internas o de las externas a las tres temperaturas estudiadas (tabla 6).

**Tabla 5.** Porcentajes de germinación durante los años 2006 y 2007 en los cultivares Hass y Fuerte.

	2006	2007	t Student
<b>Hass</b>	18,62	31,58	0,001
<b>Fuerte</b>	6,5	8,8	0,022

\*Significativa al 0,05



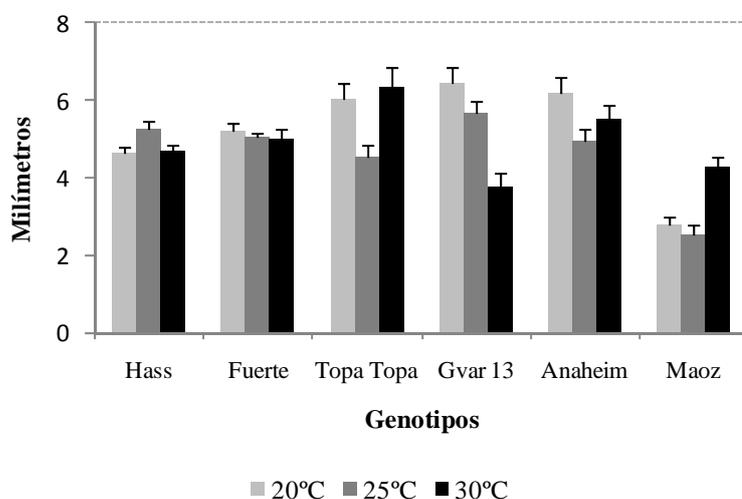
**Tabla 6.** Porcentajes de germinación a las diferentes temperaturas estudiadas usando polen obtenido a partir de las anteras internas y externas de los cultivares Hass y Fuerte.

	20°C	25°C	30°C
<b>Hass anteras internas</b>	34	34	36
<b>Hass anteras externas</b>	28	25	32
<b>t Student</b>	0,223	0,036	0,423
<b>Fuerte anteras internas</b>	10	10	9,4
<b>Fuerte anteras externas</b>	7,5	6	4,8
<b>t Student</b>	0,35	0,002	0,007

\* Significativa al 0,05

### *Longitud del tubo polínico in vitro*

La longitud del tubo polínico se estimó para los distintos genotipos y bajo los distintos regímenes de temperatura. Del mismo modo que los distintos genotipos mostraron diferencias en cuanto a su porcentaje de germinación presentaron variaciones en la longitud de sus tubos polínicos (Figura 5).



**Figura 5.** Longitud de los tubos polínicos en un medio artificial de distintos genotipos de aguacate bajo distintas condiciones de temperatura. Las barras representan el error estándar.

La temperatura tuvo un efecto en la longitud de los tubos polínicos. En el caso del cultivar ‘Hass’ se obtuvieron diferencias significativas en la longitud de los tubos polínicos ( $p=0,02$ ) entre las distintas temperaturas, siendo a 25°C a la que los tubos presentaron una mayor longitud.



La máxima longitud de tubo se obtuvo a 20°C en el cultivar ‘Gvar 13’ con un valor de 6,45 mm. Además, en el caso de ‘Hass’ se han observado diferencias en la longitud de los tubos polínicos de aquellos granos de polen procedentes de las anteras internas y de las externas. En este caso, a diferencia del porcentaje de germinación, la longitud del tubo polínico es inferior en polen procedente de las anteras internas y no se ha detectado variación en función de la temperatura.

A 25°C la longitud de los tubos osciló desde 1,93 mm en ‘Maoz’ a 5,66 mm en ‘Gvar 13’. Bajo estas condiciones de temperatura se pudo distinguir claramente del resto un único genotipo, ‘Maoz’ ( $p < 0,01$ ), que mostró la mínima longitud de tubos.

A 20°C la longitud alcanzada varió desde 1,9 mm en ‘Maoz’ a 6,16 mm en ‘Gvar 13’. En estas condiciones se establecieron tres grupos. El primero de ellos está formado por un único genotipo ‘Maoz’, el segundo está formado por ‘Hass’ y el tercero incluye al resto de los genotipos. A 30°C la mínima longitud alcanzada fue de 3,6 mm (‘Maoz’) y la máxima fue de 6,3 mm (‘Topa Topa’), observándose diferencias significativas entre ‘Maoz’ y el resto de los genotipos ( $p < 0,001$ ).

## DISCUSIÓN

El principal objetivo de este trabajo consistía en determinar el efecto de la temperatura en la germinación del polen de diferentes genotipos de aguacate, con la finalidad de llevar a cabo una selección de cultivares basada en la respuesta del polen a la temperatura. El conocimiento de los límites de susceptibilidad de la viabilidad del polen y del cuajado podría permitir seleccionar un polinizador óptimo en función de las condiciones ambientales. Tras ensayar los medios de germinación *in vitro* de aguacate disponibles en la literatura (Sahar y Spiegel, 1984; Loupassaki et al., 1997) se comprobó que la germinación obtenida era muy baja (10%) y con un elevado porcentaje de granos de polen estallados por lo que se decidió optimizar los medios disponibles para aumentar el porcentaje de germinación y disminuir el porcentaje de granos de polen estallados.



## Optimización del medio de germinación *in vitro*

El método más efectivo para la germinación de polen combina un alto porcentaje de germinación con un mínimo de granos de polen que estallan. En este trabajo, estos requisitos se cumplieron en el medio compuesto por un 10% de sacarosa y un 23 % de PEG. La sacarosa actúa como fuente nutritiva, no observándose germinación en los medios que presentan una concentración inferior al 10%. Variaciones en el efecto de las distintas concentraciones de sacarosa están asociadas a variaciones en el potencial osmótico del medio. Los granos de polen son heterótrofos y contienen algunos materiales de reserva que son usados durante la fase autótrofa de germinación; sin embargo, estas reservas no son suficientes para mantener la importante síntesis del material de la pared celular que tiene lugar durante el crecimiento del tubo polínico. Visser (1955) sugirió que la sacarosa juega un importante papel únicamente generando las condiciones osmóticas óptimas para la germinación de polen. Posteriormente, se ha puesto de manifiesto, en experimentos en los que se usan azúcares marcados con  $C^{14}$ , que éstos se emplean durante el desarrollo del tubo polínico (Kelley, 1957). Actualmente se reconoce el doble papel de la sacarosa, como fuente nutritiva y como regulador osmótico (revisado en Taylor y Hepler, 1997). Por otra parte el PEG actúa como regulador osmótico y su efectividad se ha puesto de manifiesto en distintos trabajos (Subbaiah, 1984; Read et al., 1993; Shivanna y Sawhney, 1995;)

El calcio y el magnesio juegan un papel importante tanto en la germinación de los granos de polen (Brewbaker y Kwack, 1963) como en el crecimiento de los tubos polínicos (Picton y Steer, 1983).

Los niveles más altos de germinación se consiguieron en el medio compuesto de 100 mg/L  $KNO_3$ , 100 mg/L  $H_3BO_3$ , 300 mg/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 480 mg/L  $Ca(NO_3)_4 \cdot H_2O$ , 10% sacarosa y 23% PEG. La diferencia fundamental entre el medio de cultivo desarrollado en este trabajo y el medio descrito previamente en aguacate (Sahar y Spiegel, 1984; Loupassaki et al., 1997) radica en la



presencia de PEG. Esto permite incrementar el porcentaje de germinación y reducir considerablemente el porcentaje de granos que eclosionan.

## **Efecto de la temperatura sobre el comportamiento *in vitro* de los granos de polen**

### *Efecto de la temperatura sobre la germinación in vitro*

El comportamiento del polen es un componente de gran importancia determinando los procesos de fecundación en plantas. En aguacate, trabajos anteriores han descrito que la temperatura a la que se obtiene una germinación óptima de polen oscila entre 25 y 29°C (Sedgley, 1977a; Sedgley y Annells, 1981; Sedgley y Grant, 1983) coincidiendo con la temperatura idónea para la obtención de un cuajado satisfactorio en campo. Este rango de temperatura también es el idóneo para otros frutales tropicales como el mango (Sukhvibul et al., 2000).

En este trabajo la viabilidad del polen se ha estimado en base al porcentaje de germinación *in vitro* para poder comparar los diferentes genotipos sin verse afectados por la interacción con el genotipo femenino. Sin embargo hay que tener en cuenta que una baja capacidad de germinación *in vitro* no necesariamente indica que esto ocurra *in vivo* puesto que el medio *in vitro* no presenta la composición óptima del estigma. Por otra parte, el aguacate tiene polen binucleado; este tipo de polen suele germinar mejor en un medio artificial (Stanley y Likens, 1974 que el polen trinucleado como el chirimoyo (Rosell et al., 1999; Lora et al., 2006).

Trabajos anteriores indicaban que el rango óptimo para la germinación *in vitro* del polen era entre 25 y 29°C (Loupassaki et al., 1997). En este trabajo ampliamos el rango a 20-30°C. No obstante, hay que tener en consideración que la viabilidad del polen mostró gran variación en función del genotipo, no encontrándose grandes diferencias entre las temperaturas analizadas en la



mayoría de los genotipos con la única excepción de ‘Maoz’ que podría explicarse teniendo en cuenta su origen racial. ‘Maoz’, es un genotipo de raza Antillana que se encuentra adaptado a condiciones cálidas, mientras que el resto de los genotipos, que pertenecen a las razas Mejicana y Guatemalteca, se adaptan bien a climas más frescos. Teniendo en cuenta que las temperaturas prevalecientes durante la etapa de floración en campo en nuestras condiciones de cultivo en el momento en el que las anteras se encuentran dehiscentes oscilan entre 15 y 27,13°C no se esperan grandes cambios en la capacidad de germinación a lo largo del día. Sin embargo, las temperaturas mínimas no serían óptimas para la germinación de polen de los genotipos Antillanos.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten definir dos grupos claramente diferenciados en cuanto a la viabilidad del polen. Así, ‘Topa Topa’, ‘Maoz’ y ‘Fuerte’ presentan un menor porcentaje de germinación mientras que ‘Anaheim’, ‘Gvar 13’ y ‘Hass’ presentan un porcentaje de germinación más alto. En el primer grupo se incluyen el genotipo Antillano junto con dos genotipos de floración temprana; la floración de ‘Topa Topa’ comienza en febrero y la de ‘Fuerte’ en marzo. En los meses de febrero y marzo las medias de temperatura diurnas fueron inferiores a las analizadas en este trabajo *in vitro*. En el segundo grupo se encuentra ‘Gvar 13’ que es de raza Mejicana, ‘Anaheim’ es de raza Guatemalteca y ‘Hass’, que en ocasiones se ha descrito como Guatemalteca puro (Ashworth y Clegg, 2003) y en ocasiones como un híbrido GxM (Schnell et al., 2003) o como Gx(GxM) (Chen et al., 2008). Estos dos últimos muestran menor tolerancia a bajas temperaturas que la raza Mejicana y mayor que la Antillana. Por consiguiente, este comportamiento diferencial podría explicarse como consecuencia de las diferentes adaptaciones climáticas que presentan las tres razas y, aquellos cultivares cuyo polen presenta una mayor capacidad de germinación y son más tolerantes a un amplio rango de temperatura, podrían adaptarse bien a una distribución geográfica más amplia.

Por otra parte, el aguacate se caracteriza por presentar alternancia productiva, es decir, presenta un año de alta producción seguido de un año de



## Capítulo 1

baja cosecha. En el año de alta cosecha se ha observado que la viabilidad del polen en los cultivares ‘Hass’ y ‘Fuerte’ es mayor que en el año de baja producción; de esta forma, en los años de alta producción, ésta se vería favorecida no sólo por la mayor producción de flores y de polen sino además, por la producción de polen con mayor viabilidad.

La observación de que se produce una mayor germinación del polen de las anteras internas puede tener efectos sobre la polinización en la fase masculina, ya que se ha observado que el estigma puede ser receptivo en esa fase y que, en el momento de la apertura de las flores masculinas, las anteras internas pueden estar en contacto con el estigma (ver capítulo 2). Por otra parte, esta diferencia puede ser debida a diferencias en el desarrollo entre los estambres internos y externos, lo que se ve reflejado en estudios de desarrollo con microscopía electrónica (Buzgo et al., 2007) en los que los estambres internos parecen estar más avanzados en su desarrollo aunque la dehiscencia ocurre al mismo tiempo.

### *Longitud del tubo polínico in vitro*

La temperatura tuvo un claro efecto en la longitud de los tubos polínicos y, además, se encontraron diferencias entre genotipos. Así, ‘Maoz’ fue el genotipo que presentó la mínima longitud de tubos al igual que la mínima germinación. Además, tanto la germinación como el crecimiento del tubo polínico se ven afectados positivamente por el incremento de temperatura, lo que afianza la idea de que bajo las condiciones de cultivo del sureste español no sería un buen candidato como polinizador puesto que requiere de temperaturas más cálidas.

En los genotipos ‘Hass’, ‘Fuerte’ y ‘Anaheim’ la temperatura tampoco afectó al crecimiento de los tubos polínicos. Por el contrario, el crecimiento de los tubos de ‘Gvar 13’ se ve afectado negativamente por el incremento de temperatura, mientras que en el caso de ‘Topa Topa’ el crecimiento fue óptimo en las condiciones más cálidas.



Aunque el método de germinación *in vitro* se considera como un método adecuado para estudios de viabilidad del polen por su facilidad y rapidez sería necesario completar este trabajo estudiando la viabilidad del polen en base al cuajado (Shivanna y Johri, 1989). Trabajos posteriores evaluando el efecto de la temperatura durante el desarrollo del grano de polen pueden arrojar luz sobre el efecto de la temperatura sobre la fase reproductiva en un sentido más amplio ya que hay evidencias que ponen de manifiesto que si durante este periodo se somete a las flores a un estrés térmico la viabilidad del polen se ve mermada hasta en un 50% (Issarakraisila y Considine, 1994).

Los resultados de este trabajo indican que la temperatura tiene un efecto sobre la germinación de polen y el crecimiento del tubo polínico en aguacate y que existe un comportamiento diferencial dependiendo del origen racial de los cultivares, lo que tiene claras implicaciones de cara a la utilización de diferentes variedades como polinizadores; la metodología descrita en este trabajo permitiría una selección precoz de los genotipos más adaptados a las diferentes temperaturas.





## **2 EFECTO DE LA TEMPERATURA Y DE LA HUMEDAD RELATIVA SOBRE LA FASE PROGÁMICA**

### **INTRODUCCIÓN**

La fase progámica es la fase comprendida entre la polinización y la doble fecundación del saco embrionario (Linskens, 1986). La interacción polen-pistilo juega un importante papel en la fase progámica (Linskens, 1986) puesto que interviene en la selección del parental masculino convirtiéndose en un factor de gran importancia en los procesos evolutivos de las angiospermas (Mulcahy, 1979). Durante esta interacción tiene lugar una intensa competición entre granos de polen que afectará a la composición genética de la progenie y se puede ver alterada modificando la densidad del polen sobre el estigma o la distancia a lo largo de la que los tubos polínicos crecen y compiten (Schlichting et al., 1987; Hormaza y Herrero, 1992).

La polinización es el primer paso por el que se produce el intercambio de genes entre plantas (polinización cruzada) o la recombinación dentro de una planta (autopolinización). En aguacate se distinguen tres mecanismos de transferencia de polen: fecundación cruzada en la que el polen se transfiere de una flor a otra de diferente genotipo, geitonogamia cuando ocurre entre flores del mismo genotipo y autopolinización cuando el polen procede de la misma flor. El aguacate, debido a que presenta dicogamia protogámica, se ha considerado como una especie cuyo mecanismo de reproducción principal es la fecundación cruzada.

Durante el proceso de polinización, la viabilidad del polen y la receptividad estigmática son factores críticos en la interacción polen-pistilo y, por tanto, en la fructificación. El estigma es la primera estructura con la que se encuentran los granos de polen y donde tiene lugar la hidratación, la germinación y el crecimiento inicial del tubo polínico. En esta fase tiene lugar una importante interacción entre polen y estigma (revisado en Hiscock y Allen, 2008). Para que



esta serie de procesos tengan lugar, el estigma debe ser receptivo. La receptividad estigmática es muy variable entre especies oscilando desde unas pocas horas a varios días (Heslop-Harrison, 2000; Yi et al., 2006) mostrando además gran variabilidad en función de las condiciones ambientales. El final del periodo de receptividad estigmática se ha asociado con la degeneración de las papilas, aunque en algunas especies como el almendro (Yi et al., 2005) a pesar de que esta superficie estigmática se vuelva necrótica continua siendo receptiva.

El periodo efectivo de polinización se ha definido como el periodo durante el cual la polinización es efectiva para producir frutos (Williams, 1966), por lo que adquiere gran importancia condicionando el cuajado. Este periodo se restringe por limitaciones en tres eventos principales: receptividad estigmática, cinética del tubo polínico y longevidad del óvulo (revisado en Sanzol y Herrero, 2001). Además, éste periodo se ve modificado por las condiciones ambientales, siendo la temperatura uno de los factores más influyentes en su duración puesto que afecta a pasos relevantes como son la receptividad estigmática (Burgos et al., 1991; Egea et al., 1991; Kumar et al., 1995; Hedly et al., 2003), la germinación y el crecimiento del tubo polínico (Lewis, 1942; Williams, 1970; Elgersma et al., 1989), la longevidad del óvulo (Tompson y Liu, 1973; Stösser y Anvari, 1982; Postweiler et al., 1985) y el cuajado (Jackson y Hamer, 1980; Mellenthin et al., 1972; Vasilakakis y Porlingis, 1985; Cuevas et al., 1994). Así, se ha descrito que el incremento de la temperatura acelera el crecimiento del tubo polínico y la degeneración del estigma (Egea et al., 1991; Burgos et al., 1991; Hedly et al., 2003), el desarrollo del óvulo (Stösser y Anvari, 1982) y su degeneración (Cerovic y Ruzic, 1992; Postweiller et al., 1985) mientras que, por otra parte, las bajas temperaturas reducen el crecimiento del tubo polínico (Williams, 1979; Socias i Company et al., 1976) e incrementan el tiempo de viabilidad del óvulo (Burgos y Egea, 1993; Stösser y Anvari, 1982).

La duración de la receptividad estigmática es muy variable en función de la especie oscilando desde una hora hasta varios días (Heslop-Harrison, 2000). Así, por ejemplo, en el caso de la teca (*Tectona grandis*) puede durar varias horas (Tangmitcharoen y Owens, 1997), cinco días en el caso de *Silene vulgaris*



(Young y Gravitz, 2002) e incluso más de una semana en el caso de *Eucalyptus* (Heslop-Harrison, 2000). En el caso del peral, los granos de polen pueden adherirse al estigma inmaduro, aunque, todavía no reúne las condiciones óptimas para que germinen (Sanzol et al., 2003).

A pesar del interés que presenta la duración del periodo efectivo de polinización en aguacate, no se tiene información clara en esta especie del efecto de las condiciones ambientales sobre el PEP. En esta especie se ha descrito que cuando las flores abren en estado masculino el estigma ya no se muestra receptivo y, aunque la germinación del polen tenga lugar, los tubos polínicos no alcanzan el óvulo (Sedgley, 1977a; Shoval, 1987). Sin embargo, en otros trabajos se ha descrito que la fecundación puede tener lugar tras la polinización en la fase masculina (Davenport, 1989, 1991, 1999; Davenport et al., 1994). Debido a estos argumentos contradictorios en este trabajo se ha planteado el estudio del efecto de diferentes condiciones de temperatura y de humedad relativa existentes durante la floración sobre la receptividad estigmática y el crecimiento del tubo polínico en el estilo, permitiendo el desarrollo de estrategias encaminadas a optimizar la polinización y el cuajado.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal**

En este trabajo se utilizó como parental femenino el cultivar Hass y se emplearon dos cultivares como parentales masculinos ‘Hass’ y ‘Fuerte’. Las flores de ‘Fuerte’ se usaron para polinizar las flores de ‘Hass’ en estado femenino, mientras que las de ‘Hass’ para polinizar flores de ‘Hass’ en estado masculino. Las flores empleadas como parentales femeninos se recogieron justo en el momento de anthesis mientras que las que se usaron como donadoras de polen se recogieron en el momento de la dehiscencia de las anteras.



## **Efecto de la temperatura y la humedad relativa sobre la receptividad estigmática**

Se llevaron a cabo dos ensayos de forma paralela, uno en campo y otro en cámaras de cultivo, donde fue posible el control de las condiciones de temperatura y humedad.

### *Caracterización de las flores*

Habitualmente, la receptividad se evalúa en base a la actividad enzimática y a la capacidad del estigma para permitir la germinación del polen y la fecundación (Dafni y Maues, 1989; Sanzol et al., 2003). Uno de los métodos estándar para evaluar la receptividad es llevando a cabo polinizaciones controladas en diferentes momentos y estimar la germinación del polen así como el crecimiento del tubo polínico (Shivanna y Rangaswamy, 1992).

En este ensayo, para la evaluación de la receptividad estigmática, las flores se polinizaron en diferentes momentos del día. Para ello, dividimos el ciclo floral en 6 partes, tres de ellas durante el estado femenino y otras tres en el masculino, estableciéndose de este modo seis poblaciones de flores. Las flores se polinizan en el estado femenino y en el masculino a distintos tiempos en cada población de flores: en el momento de anthesis, a mitad de su apertura y justo cuando empiezan a cerrar. En el estado femenino las polinizaciones se realizan por contacto directo con las anteras de las flores del cultivar Fuerte y en el estado masculino con flores del cultivar Hass, no siendo posible el uso del mismo cultivar como donador de polen en los distintos estados debido a la dicogamia que presenta la especie.

### *Polinización*

Para evaluar la receptividad estigmática, se recogieron aproximadamente 60 flores por tratamiento y se mantuvieron en espuma de florista humedecida. Este método de cortar las flores y colocarlas en cámaras nos permite controlar las condiciones evitando así la influencia de otros posibles factores ambientales. En el primer ensayo se estudió el efecto de cuatro temperaturas que cubren el rango



de las observadas durante la etapa de floración: 15, 20, 25 y 30°C. En el segundo ensayo se estimó el efecto de tres humedades relativas: 50, 75 y 95% en flores mantenidas a una temperatura de 25°C.

Además también se realizó un ensayo en campo donde las flores se cubrieron con una malla en el momento de la antesis para impedir el contacto con las abejas evitando polinizaciones indeseadas. Para las polinizaciones en campo las flores se dividieron en distintos grupos que se polinizaron en distintos momentos del día. De este modo en el estado femenino se establecieron tres grupos, uno de los cuales se polinizó a las 12:00, el segundo a las 13:30 y el tercero a las 15:00. En las flores en el estadio masculino también se establecieron tres grupos, uno de los cuales se polinizó a las 16:30, el segundo a las 18:00 y el tercero a las 19:30. Se polinizó un total de 60 flores por tratamiento.

#### *Preparación del material para el microscopio*

Durante los tres días posteriores a la polinización se recogieron 20 flores diariamente de cada uno de los tratamientos y se fijaron en FAA (Johansen, 1940). Posteriormente, se lavaron durante 3 horas en agua destilada y se mantuvieron durante toda la noche a 4°C en sulfito sódico al 5%. Tras este tiempo se sometieron a una presión de 1Kg/cm<sup>2</sup> durante 10 minutos en un autoclave (Jefferies y Blecher, 1974). Los pistilos se prepararon mediante aplastamiento (squash) con azul de anilina al 0,1% en P<sub>0</sub><sub>4</sub>K<sub>3</sub> 0,1N (Linskens y Esser, 1957) para la observación de la adhesión y germinación de los granos de polen y el crecimiento de los tubos polínicos. Una vez montadas las preparaciones se visualizaron con un microscopio de fluorescencia de luz incidente para luz violeta Ortolux II.



**Figura 1.** Flores de aguacate mantenidas en espuma de florista.

### *Evaluación de la receptividad estigmática*

La receptividad estigmática se evaluó como la capacidad del estigma para permitir la germinación de los granos de polen y el crecimiento de los tubos polínicos a través del tejido transmisor. Se contó el número de granos de polen adheridos y los granos de polen germinados en el estigma bajo las diferentes condiciones de temperatura y humedad relativa para el cálculo del porcentaje de germinación. Se consideraron como granos de polen germinados aquellos que presentaron un tubo polínico cuya longitud era al menos el doble del diámetro del grano de polen.

### **Efecto de la temperatura sobre el crecimiento del tubo polínico *in vivo***

#### *Material vegetal*

Para llevar a cabo el estudio del efecto de la temperatura en el comportamiento del polen *in vivo*, se recogieron flores del cultivar Hass en el momento de antesis, y se mantuvieron en espuma de florista humedecida bajo condiciones de temperatura controladas en una cámara de crecimiento. En este ensayo se emplearon temperaturas que cubren el rango de las registradas durante los meses de floración en nuestras condiciones de cultivo: 10, 20 y 30°C con un fotoperiodo de 15 horas. Las flores empleadas se corresponderían con las flores que en el caso anterior hemos considerado como B (flores en estado femenino a



mitad de su etapa de apertura). Se polinizaron usando flores del cultivar Fuerte que se recogieron en el momento en el que sus anteras empezaron a liberar polen; el polen se aplicó mediante contacto directo de las anteras con el estigma de las flores de 'Hass'. Se recogieron y fijaron en FAA (formalina: ácido acético: 70% etanol v/v 1:1:18) un mínimo de 10 pistilos 2, 4, 6, 8, 24, 30 y 48 horas después de la polinización.

### *Preparación del material para el microscopio*

Para el estudio del comportamiento del polen, se lavaron los pistilos con agua destilada durante tres horas; posteriormente se mantuvieron durante toda una noche a 4°C en sulfito sódico al 5%. Al día siguiente se sometieron durante 10 minutos a 1 Kg/cm<sup>2</sup> de presión en el autoclave (Jefferies y Belcher, 1974) lo que permitió ablandar los tejidos facilitando el aplastamiento así como evitar la proliferación de hongos en el material vegetal. En cada pistilo se diseccionó el óvulo y se tiñó con unas gotas de azul de anilina en K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 N (Linkens y Esser, 1957), aplastándolos entre porta y cubreobjetos (*squash*). Estas preparaciones se conservaron durante una noche a 4°C y en un ambiente húmedo para ser visualizados al día siguiente al microscopio de fluorescencia Leica DM LB2 con un filtro excitador 515-560 y filtro bloqueador LP 590. La dinámica de los tubos polínicos se analizó contando el número de tubos polínicos que habían alcanzado la parte superior del estilo, la parte media y la base del estilo y se expresó como la relación de tubos que habían alcanzado cada punto del estilo dividido entre el número de granos de polen que habían germinado en el estigma (Hedhly et al., 2004). En aguacate, no es posible analizar el efecto de la temperatura contando el número de tapones de callosa que se van acumulando conforme el tubo polínico va creciendo como se ha sugerido por Snow y Spira (1991) puesto que los tapones de callosa no se distinguen claramente a lo largo del tubo polínico.



### **Viabilidad del óvulo**

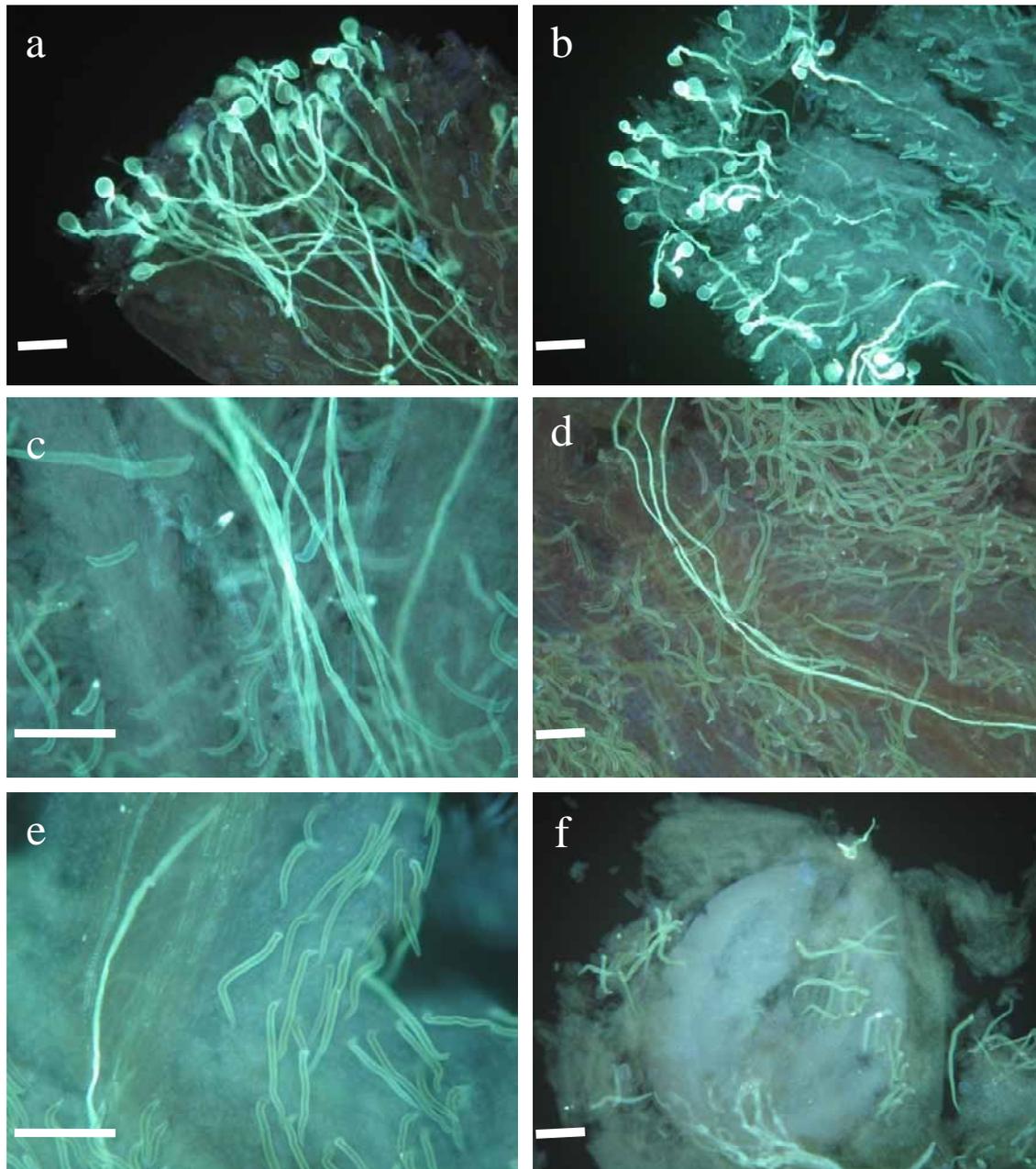
Para el estudio de la viabilidad del óvulo, se emplearon los óvulos de los pistilos del ensayo anterior y se procesaron como se ha descrito anteriormente para ser visualizados con la tinción de azul de anilina. El azul de anilina tiñe la callosa, un polisacárido compuesto por 1-3  $\beta$  glucanos, que se deposita en la pared del tubo polínico durante su crecimiento y permite valorar la viabilidad del óvulo de acuerdo a Anvari y Stösser (1978) puesto que los óvulos no viables emiten fluorescencia mientras que los viables no lo hacen.

### **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS 15.00. Los datos de porcentaje, previa transformación angular (arco seno), se analizaron con un ANOVA. El establecimiento de los grupos para los que existían diferencias se realizó con el test de Duncan.

## **RESULTADOS**

La fase progámica en aguacate se inicia con la adhesión y germinación del grano de polen en el estigma (2a y 2b). Los tubos polínicos crecen a lo largo del estilo (2c) y su número se reduce considerablemente a medida que descienden por el estilo, de tal forma que solo uno o dos tubos alcanzan la base del estilo (2d). En la mayoría de los casos, un único tubo polínico llega al ovario (2e) para posteriormente fecundar al óvulo (2f).



**Figura 2.** (a) Germinación de granos de polen y crecimiento inicial del tubo polínico en flores polinizadas en estado femenino. (b) Germinación de granos de polen y crecimiento inicial del tubo polínico en flores polinizadas en estado masculino. (c) Crecimiento de los tubos polínicos en la parte media del estilo de flores polinizadas en estado femenino. (d) Reducción progresiva del número de tubos polínicos a lo largo del estilo. (e) Tubo polínico en el ovario. (f) Llegada de un tubo polínico al óvulo. Barra= 100  $\mu$ m. Tinción: azul de anilina.



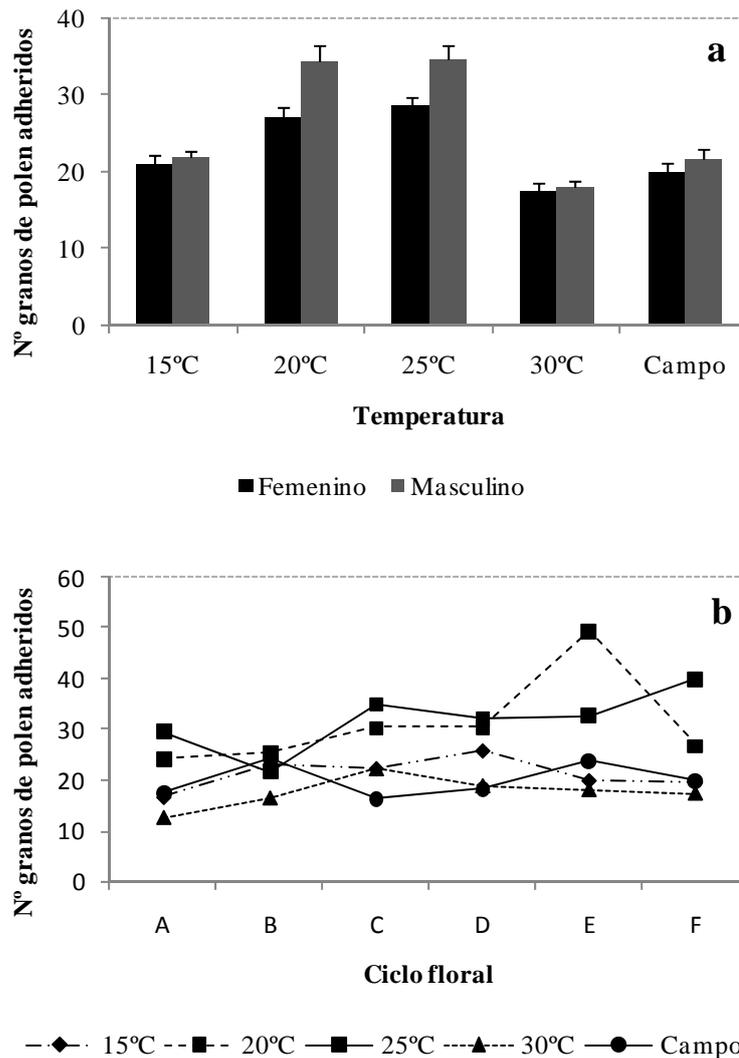
## **Efecto de la temperatura en la receptividad estigmática**

La polinización efectiva va seguida de la adhesión de los granos de polen y su posterior hidratación, aunque los granos de polen hidratados no siempre germinan. La receptividad estigmática se ha evaluado en base a la adhesión de polen, germinación y crecimiento del tubo polínico a lo largo del estilo.

### *Adhesión del polen*

El efecto de la temperatura en la adhesión del polen se ha estudiado tanto en el estado femenino como masculino.

Se observa que se produce adhesión de polen al estigma durante todo el proceso de apertura y cierre de las flores, desde el momento de la apertura en estado femenino hasta el momento en que las flores comienzan a cerrar en estado femenino (Figura 3). Por otra parte, tanto en el estado masculino como femenino se encontraron diferencias significativas en base a la temperatura ( $p < 0,001$ ). En el estado femenino la máxima adhesión se obtuvo a 20 y 25°C, mientras que a 15, 30°C y bajo las condiciones existentes en el campo esta adhesión disminuyó significativamente ( $p = 0,001$ ). La temperatura media en el campo entre las 11:00 y las 15:00 (momento en el que las flores se encuentran abiertas en estado femenino) era de 21,04. Este mismo comportamiento se observó en el estado masculino donde fue evidente una disminución de la adhesión a medida que aumentaba la temperatura así como bajo las condiciones de campo ( $p < 0,001$ ). Por lo tanto, en ambos estados la mayor adhesión se consigue a 20 y 25°C disminuyendo significativamente a medida que nos alejamos de este rango (Figura 3).



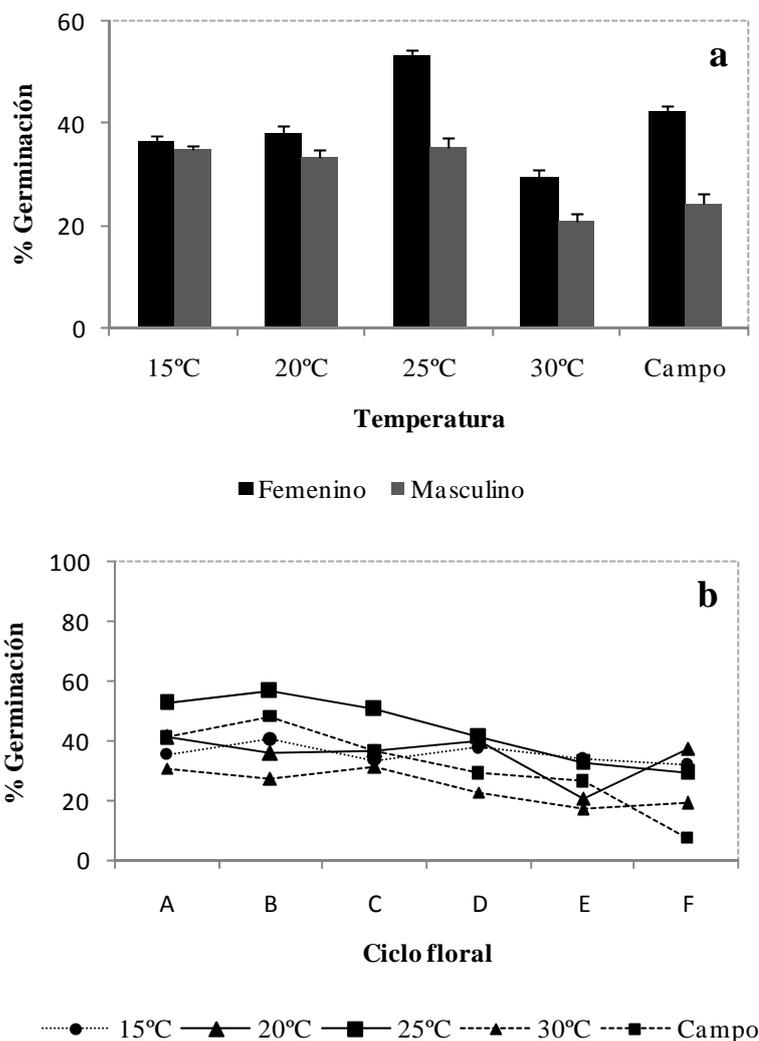
**Figura 3.** Efecto de la temperatura en la adhesión de los granos de polen. **(a)** Diferencias en la adhesión observada en estado masculino y en estado femenino. **(b)** Número de granos de polen adheridos bajo cinco condiciones de temperatura a lo largo del ciclo floral, siendo A el momento en el que las flores abren en estado femenino, B, a mitad del estado femenino, C, el momento en el que las flores comienzan a cerrar al final del estado femenino, D, momento en el que las flores abren en estado masculino, E mitad del periodo en estado masculino y F momento en el que las flores comienzan a cerrar en el estado masculino.

### *Porcentaje de germinación*

Cuando analizamos el efecto de la temperatura en el estado femenino, encontramos porcentajes de germinación que oscilan desde 0 a 85% obteniéndose el máximo a 20 y 25°C y el mínimo cuando la temperatura incrementaba hasta 30°C. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de germinación a 15, 20°C y bajo las condiciones de campo. A 20°C no se observaron diferencias significativas entre los dos estados ( $p > 0,05$ ); sin



embargo, a 25°C la germinación fue significativamente inferior en el estado masculino. A diferencia de la adhesión, en el caso del porcentaje de germinación este fue superior en el estado femenino, aunque en ambos estados se observó una disminución importante con el incremento de la temperatura (Figura 4). No obstante, se observa germinación durante todo el proceso en el que las flores están abiertas, desde la apertura en estado femenino hasta el cierre en estado masculino.



**Figura 4.** Efecto de la temperatura en el porcentaje de germinación de los granos de polen. (a) Diferencias en la germinación observada en estado masculino y en estado femenino. (b) Porcentaje de germinación bajo cinco condiciones de temperatura a lo largo del ciclo floral, siendo A el momento en el que las flores abren en estado femenino, B, a mitad del estado femenino, C, el momento en el que las flores comienzan a cerrar al final del estado femenino, D, momento en el que las flores abren en estado masculino, E mitad del periodo en estado masculino y F momento en el que las flores comienzan a cerrar en el estado masculino.

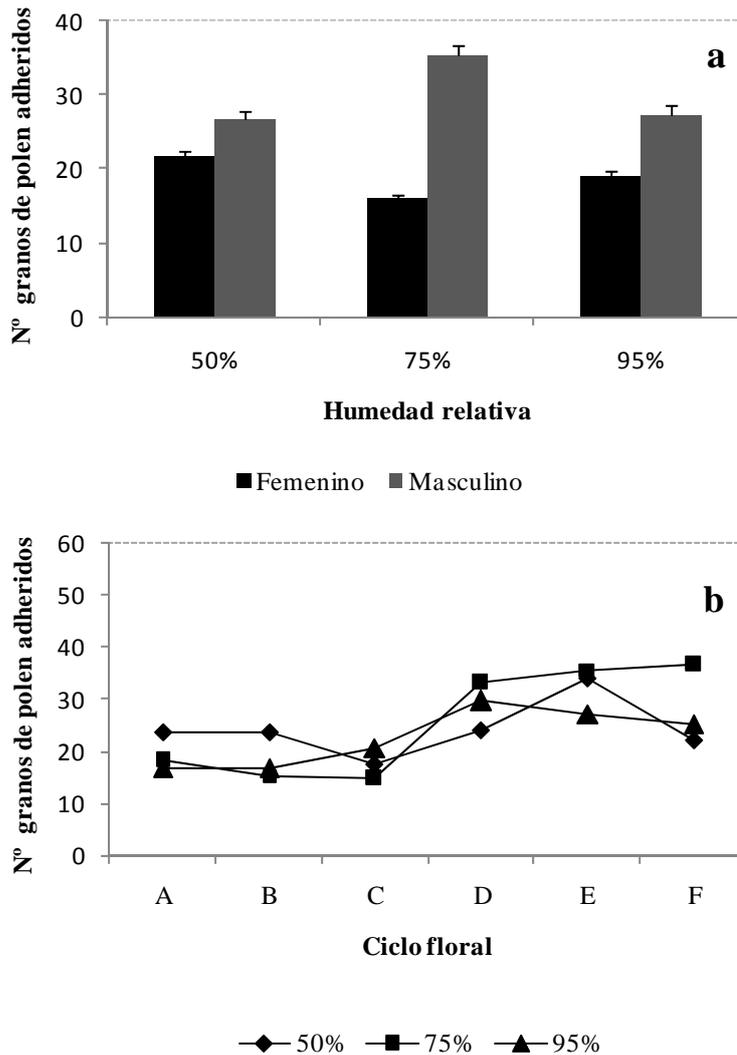


## **Efecto de la humedad relativa en la receptividad estigmática**

### *Adhesión de polen*

El efecto de la humedad relativa sobre la adhesión del polen se ha estudiado también en el estado femenino y en el masculino, siendo las condiciones necesarias para obtener la máxima adhesión de polen, diferentes en ambos estados. Así, en el estado femenino la máxima adhesión se obtuvo cuando la humedad relativa era del 50% ( $p < 0,05$ ) mientras que en el estado masculino cuando la humedad era del 75% ( $p < 0,001$ ). Bajo las diferentes condiciones de humedad relativa analizadas, la adhesión del polen fue siempre mayor en el estado masculino que en el femenino (Figura 5a).

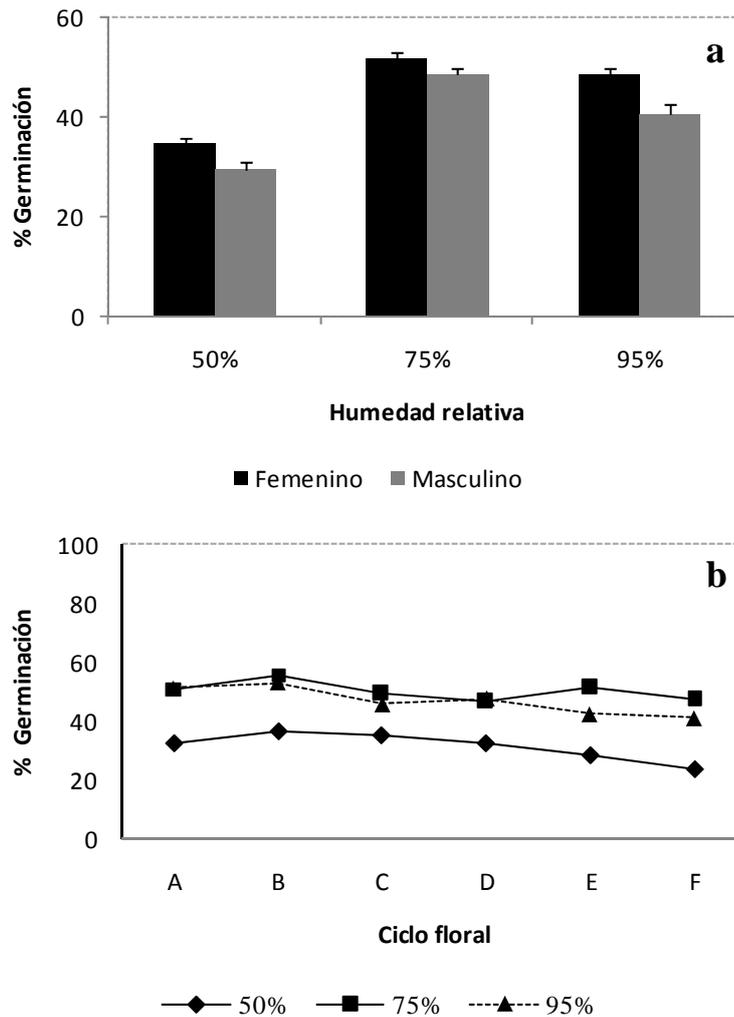
Además, al estimar la adhesión a lo largo del estado femenino, observamos que justo en el momento de la apertura y dos horas más tarde, la máxima adhesión se obtenía al 50%; sin embargo, la máxima adhesión justo en el momento en el que las flores empiezan a cerrar al final del estado femenino (flor tipo C) se consigue a 95%. En el estado masculino la mínima adhesión se obtuvo al 50% de humedad y la máxima durante toda la etapa masculina se consiguió al 75% (Figura 5b).



**Figura 5.** Efecto de la humedad relativa en la adhesión de los granos de polen. **(a)** Diferencias en la adhesión observada en estado masculino y en estado femenino. **(b)** Número de granos de polen adheridos bajo tres humedades relativas a lo largo del ciclo floral, siendo A el momento en el que las flores abren en estado femenino, B, a mitad del estado femenino, C, el momento en el que las flores comienzan a cerrar al final del estado femenino, D, momento en el que las flores abren en estado masculino, E mitad del periodo en estado masculino y F momento en el que las flores comienzan a cerrar en el estado masculino.

### *Germinación de polen*

Por otra parte, al evaluar el efecto de la humedad relativa en el porcentaje de germinación en ambos estados se observa que la máxima germinación siempre se obtiene cuando la humedad relativa era de 75 y 95% disminuyendo significativamente cuando la humedad descendía al 50% ( $p=0,001$ ). De este modo, los requisitos necesarios para alcanzar la máxima adhesión y germinación son diferentes (Figura 6).



**Figura 6.** Efecto de la humedad relativa en el porcentaje de germinación de los granos de polen. **(a)** Diferencias en la germinación observada en el estado masculino y en el femenino. **(b)** Porcentaje de germinación bajo tres humedades relativas a lo largo del ciclo floral, siendo A el momento en el que las flores abren en estado femenino, B, a mitad del estado femenino, C, el momento en el que las flores comienzan a cerrar al final del estado femenino, D, momento en el que las flores abren en estado masculino, E mitad del periodo en estado masculino y F momento en el que las flores comienzan a cerrar en el estado masculino.

### Efecto de la temperatura en el crecimiento del tubo polínico *in vivo*

La temperatura tuvo un claro efecto en el crecimiento del tubo polínico disminuyendo el tiempo necesario para alcanzar el óvulo conforme aumenta la temperatura. Así, a 30°C dos horas después de la polinización los tubos polínicos habían alcanzado la base del estilo y dos horas más tarde se observaron en el ovario. Los tubos polínicos penetraron el óvulo 24 horas después de la polinización.



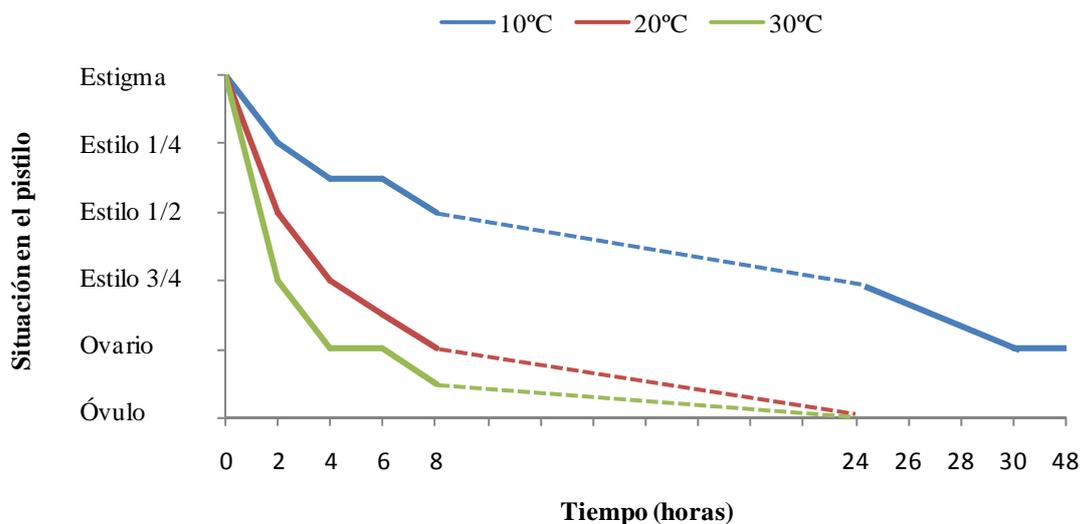
A 20°C fue necesario un tiempo de 4 horas para que los tubos llegasen a la base del estilo y tras 6 horas de la polinización en el 63% de las flores analizadas se observó el tubo polínico alcanzando el ovario necesitándose dos horas más para alcanzarlo en el total de las flores.

Al disminuir la temperatura a 10°C se puso de manifiesto un descenso en la tasa de crecimiento del tubo polínico. Dos horas después de la polinización los tubos se encontraban en la parte media del estilo, y fue necesario entre 6 y 8 horas para que los tubos alcanzasen la base del estilo. Tras 24 horas los tubos alcanzaron el ovario; sin embargo, durante las 48 horas de seguimiento no se observó ningún tubo en proximidad al óvulo. El efecto de la temperatura se refleja en la figura 7.

Aunque el tiempo requerido para alcanzar el ovario disminuyó con el aumento de temperatura, no se observaron diferencias en el número de tubos polínicos que alcanzaron la base del estilo en relación con los granos de polen germinados ( $p=0,161$ ). En la parte superior del estilo, el número de tubos polínicos osciló desde 1 a 15 con un valor medio de 6 y este número fue disminuyendo a medida que nos alejamos del estigma; así, en la parte media del estilo el número de tubos polínicos fue de dos y en la mayoría de los casos un único tubo alcanzó el ovario.

### **Efecto de la temperatura sobre la viabilidad del óvulo**

La viabilidad del óvulo juega un importante papel en el periodo efectivo de polinización (Williams, 1970) puesto que es el último paso que garantiza la fecundación. En este trabajo se puso de manifiesto que el 86% de las flores mantenidas a 30°C conservaron sus óvulos viables 48 horas después de la antesis, mientras que a 10 y 20°C los óvulos eran viables en el 100% de las flores analizadas.



**Figura 7.** Efecto de la temperatura sobre el crecimiento del tubo polínico a lo largo del pistilo. En línea discontinua se muestra el periodo en el que no se tomaron datos.

## DISCUSIÓN

### Receptividad estigmática

En este trabajo se ha estudiado el efecto de la temperatura y la humedad relativa sobre la receptividad estigmática evaluándose por separado sus efectos sobre la adhesión y la germinación de polen.

#### *Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre la adhesión del polen*

La adhesión del polen depende en parte de la naturaleza del polen y de los componentes de la superficie estigmática. En este trabajo se observaron variaciones en cuanto a la adhesión del polen entre los dos estados de la flor, obteniéndose la máxima adhesión en el estado masculino; estos resultados resultan sorprendentes puesto que sería de esperar una mayor capacidad de adhesión en el estado femenino cuando, en principio, se ha asumido que el estigma de aguacate es receptivo desde el momento de anthesis (Buzgo et al., 2007). Sin embargo, hay que tener en cuenta que parte de las diferencias observadas podrían ser debidas a que el polen empleado para polinizar en los distintos estados es distinto puesto que en el estado femenino se poliniza con



polen de 'Fuerte' y en el masculino con flores de 'Hass'. En cualquier caso los resultados demuestran que la adhesión de polen se produce también durante la fase masculina de la flor. Al contrario de las observaciones realizadas en cerezo donde se puso de manifiesto que la adhesión de los granos de polen se incrementa con el incremento de la temperatura (Hedhly et al., 2003) y se explicó en función de la aceleración de la maduración del estigma, en el caso del aguacate, probablemente la maduración del estigma se ha completado en el momento de anthesis y la secreción estigmática sea suficiente para retener el máximo número de granos de polen. Así, se puede decir que la temperatura a la que se produce mayor adhesión es a 25°C.

Respecto a la humedad relativa, parece tener más influencia en el estado masculino que femenino; en el estado femenino la máxima adhesión se obtiene cuando la humedad ambiental era muy baja (50%) lo que podría deberse a que los componentes de la secreción estigmática bajo esta condición se encuentren menos diluidos.

### *Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre la germinación del polen*

La adhesión de polen se continúa con su hidratación, consecuencia del paso de agua desde el estigma al interior del grano de polen y, una vez hidratado, se produce la germinación del grano de polen. Esta germinación también depende en gran medida de las condiciones ambientales. Así, la máxima germinación se obtiene en este trabajo bajo condiciones de temperatura entre 20 y 25°C como ya se había descrito previamente en aguacate (Loupassaki, 1995; Sahar y Spiegel-Roy, 1984; Lopassaki et al., 1997; Sedgley y Annells, 1981) coincidiendo estas condiciones con las óptimas para el cuajado (Sedgley, 1987; Sedgley y Annells, 1981). Sin embargo, en este trabajo encontramos diferencias respecto al efecto del incremento de la temperatura en el porcentaje de germinación previamente descrito en aguacate (Sedgley y Annells, 1981) observándose que cuando la temperatura supera los 25°C, la germinación del polen disminuye, viéndose este efecto muy intensificado en la germinación del polen depositado en estigmas de flores masculinas, en las que, justo en el



momento de cerrarse, a temperaturas de 30°C el estigma prácticamente ha perdido la capacidad de permitir la germinación.

El efecto negativo del incremento de la temperatura sobre la germinación de polen podría ser debido a que se acelera la degeneración de la superficie estigmática. Igualmente hay que tener en cuenta el polen empleado, puesto que en los estudios de germinación *in vitro* (Capítulo 1) también se observó que, al incrementar la temperatura, disminuye la germinación del polen de ‘Fuerte’. De hecho, el cultivar Fuerte que es un híbrido GxM, parece estar mejor adaptado a ambientes más frescos y su floración comienza 2 semanas antes que la de ‘Hass’ cuando las temperaturas son inferiores (Capítulo 7).

La humedad relativa también tiene un efecto sobre la germinación, de tal forma que las altas humedades relativas evitan la desecación del estigma incluso en el estado masculino, permitiéndose bajo estas condiciones la germinación del polen. Además, en los estudios *in vitro* se ha puesto de manifiesto la necesidad de someter al polen a un ambiente de alta humedad incrementando enormemente su capacidad de germinación (Loupassaki et al, 1997).

Sin embargo, bajo las condiciones encontradas en el campo, en el estigma de flores en estado masculino el porcentaje de germinación se reduce siendo mínimo justo antes de cerrarse la flor; estos resultados son esperados por la gran variabilidad de temperatura y humedad relativa que se observa a lo largo de la etapa de floración. Este trabajo apoya las observaciones de Davenport (1981, 1991, 1999, 1994) que sugería que la mayor deposición de polen ocurría en flores durante el estado masculino y que en estos casos podía tener lugar la fecundación.

En base a estos resultados, el estigma conserva la capacidad de permitir la germinación del polen en el estado masculino así como el crecimiento inicial del tubo polínico, por lo que, en caso de que el óvulo sea todavía viable, la fecundación podría ser posible en el estado masculino. Esta autopolinización en la fase masculina se puede considerar como un mecanismo destinado a asegurar la fecundación en aquellas situaciones en las que la fecundación en el estado femenino se encuentra dificultada. De hecho, temperaturas entre 20°C y 30°C y



altas humedades relativas son las condiciones habituales en la zona de origen del aguacate.

La extensión de la duración de la etapa de floración, la producción exuberante de flores y la extensión del periodo de receptividad estigmática podrían considerarse como mecanismos de adaptación frente a las condiciones desfavorables (Beardsell et al., 1993) y principalmente en aquellos ambientes donde la actividad del polinizador es reducida (Herrera, 1982) incrementándose de esta forma la oportunidad de polinización.

Desde un punto de vista agronómico, la duración de la receptividad es de gran interés puesto que aumenta las oportunidades de fecundación (Nepi y Pacini, 1993; Tangmitcharoen y Owens, 1997; Sornsathepornkul y Owens, 1998; Aleemullah et al., 2000) y condiciona el número de polinizadores efectivos que puedan visitar la flor. En el caso del aguacate, si se mantiene la receptividad en el estado masculino se incrementa la probabilidad de fecundación en aquellas condiciones en las que la polinización durante la fase femenina se vea dificultada permitiendo la autofecundación en el caso de que el óvulo sea todavía viable. De este modo, la autopolinización podría ocurrir no sólo por la coexistencia entre flores en estado masculino y femenino de un mismo cultivar sino que, además, por la polinización en el estadio masculino de la flor. Evidentemente, en aquellos casos en los que la polinización durante la etapa femenina no sea limitante, estos granos de polen presentarán ventajas con respecto a los que se depositen durante el estado masculino al haber germinado antes.

### **Efecto de la temperatura sobre el crecimiento del tubo polínico**

Al igual que en otras especies (revisado en Hormaza y Herrero, 1992), en aguacate, a pesar de que un gran número de granos de polen germinan en el estigma, el número de tubos polínicos disminuye conforme descienden por el estilo (Tomer y Gottreich, 1975; Sedgley, 1979), de tal forma que sólo uno conseguirá alcanzar el ovario y fecundar el óvulo. Sin embargo, se requiere de una carga mínima de granos de polen sobre el estigma para que se produzca la germinación (Hormaza y Herrero, 1996; Shoval, 1987) al mismo tiempo que se



favorece la competición entre genotipos o entre granos de polen del mismo genotipo. En este proceso de competencia, aquel genotipo cuyo tubo polínico crezca más rápido se verá claramente aventajado con respecto al resto minimizando de esta forma el efecto desfavorable de las condiciones ambientales (Tangmitcharoen y Owens, 1997).

En aguacate (Sedgley, 1977; Sedgley y Annells, 1981; Sedgley y Grant, 1983) así como en otras especies (revisado en Hedhly et al., 2009) el crecimiento del tubo polínico a lo largo del pistilo es susceptible a las condiciones de temperatura pudiendo afectar al cuajado. Así, en aguacate, se había descrito que bajo condiciones de 25°C durante el día y 20°C por la noche se requiere entre 18 y 24 horas para que el tubo polínico alcance al óvulo (Sedgley, 1979) coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo a 30°C. Sin embargo, cuando disminuye la temperatura, el crecimiento del tubo polínico se ralentiza, resultando en retraso o incluso disminución de la fecundación. De hecho, en este trabajo, en las condiciones de baja temperatura, después de 48 horas no se observó ningún tubo polínico en las proximidades del óvulo. Por tanto, el hecho de no observar fecundación a 10°C coincide con el bajo cuajado observado en condiciones de baja temperatura. A pesar del efecto de la temperatura en la dinámica del tubo, se requiere de un tiempo mínimo de 24 horas tras la polinización para que la fecundación tenga lugar, probablemente debido a la inmadurez del ovario en el momento de la antesis (Sedgley, 1979). Este periodo también se ha descrito en otras especies, en las que se requiere hasta incluso cuatro días después de que los tubos alcancen la base del estilo para que se produzca la fecundación en almendro (Polito y Pimienta, 1982) o en melocotonero (*Prunus persica*) (Herrero y Arbeloa, 1989).

De este modo, el hecho de que no se hayan observado tubos polínicos a 10°C cerca del óvulo tras 48 horas de estudio podría explicarse por una ralentización en la maduración del óvulo.



### **Viabilidad del óvulo**

El último paso de la fase progámica que garantiza la fecundación, es el hecho de que una vez que el tubo polínico alcanza el óvulo, éste sea viable. La viabilidad del óvulo es uno de los principales problemas en la formación del fruto y cuajado en muchos frutales; esta viabilidad generalmente se ve reducida con el incremento de la temperatura (Burgos y Egea, 1993; Stösse y Anvari, 1982; Hedhly et al, 2003). En este estudio se ha puesto de manifiesto que las altas temperaturas acortan el tiempo de viabilidad del óvulo pero no llega a ser un factor limitante en aquellas flores polinizadas en estado femenino.

### **Conclusión**

En este trabajo se pone de manifiesto que la humedad relativa y la temperatura juegan un importante papel en la duración de la receptividad estigmática en aguacate como ya se había descrito en otras especies (Hedhly et al., 2003, 2004, 2005). Ambientes de baja humedad relativa y altas temperaturas aceleran la desecación del estigma y por lo tanto acortan el periodo de receptividad estigmática. De esta forma, se podría concluir que, bajo condiciones de humedad relativa entre 75 y 95% y con temperaturas de 25°C las condiciones de fecundación se ven favorecidas y, por lo tanto, también las de cuajado.



**Parte II**  
**Consecuencias en el cuajado**





# 3 PATRÓN DE CRECIMIENTO Y CAÍDA DE FLORES Y FRUTOS

## INTRODUCCIÓN

La producción de más flores que frutos es una característica frecuente en especies vegetales (Stephenson, 1981) aunque el porcentaje de flores que llegan a transformarse en fruto depende de la especie y puede oscilar desde menos del 1% al 100% (Lloyd, 1980; Stephenson, 1981). La caída de flores y frutos se ha convertido en un factor limitante en la producción de muchos cultivos como cítricos (Monseline, 1986), tamarillo (Lewis y Considine, 1999) o aguacate (Cameron et al., 1952; Sedgley, 1987, Lahav y Zamet, 1999). Cuando las reservas nutritivas son limitadas, la transformación de flor en fruto se puede ver afectada incluso por la posición que ocupa dentro de la inflorescencia, por la fecha de apertura e incluso por la presencia de frutos en desarrollo (Stephenson et al., 1988; Stephenson, 1992).

Tras la antesis, comienza la transformación de flor en fruto, aconteciendo en este momento en muchas especies una caída prematura de flores (Gutián, 1993). Frecuentemente, esta caída masiva de flores y frutos en desarrollo se ha explicado en aguacate como consecuencia de una polinización inadecuada (Sedgley, 1987; Lahav y Zamet, 1999; Garner y Lovatt, 2008); sin embargo, otros factores podrían estar implicados en este proceso tales como las condiciones ambientales, la competencia por las reservas nutritivas o incluso la propia calidad de la flor. La calidad de la flor fue definida por Williams (1965) como la capacidad que presenta una flor para transformarse en fruto y parece estar condicionada por el estatus nutritivo del árbol (Lloyd, 1980) y las reservas nutritivas de la propia flor (Rodrigo et al., 2000). Así, una correlación entre los niveles de carbohidratos y la caída de flores y frutos se ha establecido en especies diversas como cítricos (García-Luis et al., 1988), albaricoquero (Rodrigo et al; en prensa), vid (Lebon et al, 2004) o pimienta (Aloni et al., 1996) (ver capítulo 4).



El aguacate es un ejemplo extremo de una exuberante floración; sin embargo, de los millones de flores que produce un árbol solo unas pocas llegarán a transformarse en fruto. Esta baja tasa de cuajado se debe a una enorme caída de flores y pequeños frutos durante los meses posteriores a la etapa de floración (Lahav y Zamet, 1999), cayendo la mayor parte de flores y frutos en desarrollo debido a una carencia de fecundación (Sedgley, 1987). Esta abscisión se ve intensificada bajo determinadas condiciones ambientales (Sedgley, 1977; Sedgley y Annells, 1981, Gafni, 1984) aunque la sensibilidad de la abscisión a las condiciones ambientales ha sido discutida recientemente (Garner y Lovatt, 2008). Además, la tasa de cuajado es muy variable dependiendo del genotipo de estudio. Así, en el caso del cultivar Fuerte, el cuajado ronda el 0,015% de las flores (Lahav y Zamet, 1999), en el cultivar Bacon el 0,03% (Inone y Takahashi, 1990) y en el cultivar Hass se ha descrito que en años de alta producción el cuajado es de 0,14% mientras que en los de baja producción es de 0,07% (Garner y Lovatt, 2008). Por otra parte, al igual que en otros frutales de hoja perenne (Monseline y Goldschmidt, 1982), los problemas de producción se ven intensificados por una alternancia productiva, aunque este proceso es independiente de la caída de flores y frutos (Garner y Lovatt, 2008). Sin embargo, no hay estudios detallados del patrón de caída de flores y frutos en aguacate desde la polinización a la recolección. Para evaluar el efecto de la polinización, en este trabajo se han estudiado dos poblaciones de flores, una polinizada manualmente y otra dejada sin polinizar.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Este estudio se realizó en una parcela monovarietal del cultivar Hass durante tres años consecutivos (2006-2008). Los genotipos empleados como donadores de polen fueron 'Fuerte', 'Marvel', 'Nobel' y 'Lamb Hass'.



### **Cálculo de la tasa de cuajado en flores dejadas a libre polinización**

El cuajado se determinó como el porcentaje de frutos obtenidos dividido entre el número de flores estimado en la floración.

En el año 2006, que coincidió con un año de baja producción de flores, se seleccionaron 500 inflorescencias distribuidas entre 42 árboles y se dejaron a libre polinización. En cada una de las inflorescencias se etiquetó cada flor y se anotó la posición que ocupaba dentro de la inflorescencia así como su fecha de apertura. Durante el siguiente año se seleccionaron 120 inflorescencias que se dividieron en 8 grupos. En los cuatro primeros se analizó el efecto de la posición en el cuajado y en los otros 4 el efecto de la fecha de antesis. De esta forma, en el primer grupo solamente se dejaron las flores que se encuentran en la primera fila, en el segundo aquellas que se encuentra en la segunda fila de la inflorescencia y así hasta el cuarto grupo. En las inflorescencias en las que se estudió el efecto de la fecha de antesis en el cuajado, en el primer grupo se dejaron solamente aquellas flores que abren durante la primera semana de floración, en el segundo aquellas que abren durante la segunda semana eliminando aquellas que abrieron durante la primera y las que tras la segunda semana aún no habían abierto y así sucesivamente hasta la cuarta semana. Cada grupo se componía de 15 inflorescencias.

En el siguiente año de estudio, 2008, que se correspondía de nuevo con un año de baja producción de flores, se marcaron 12 inflorescencias, cuyas flores fueron contadas semanalmente hasta el momento de la recolección.

La caracterización del proceso de cuajado se hizo mediante conteos semanales desde el final de la floración hasta la recolección. Con el fin de deslindar el momento de mayor caída se calculó la caída relativa como el porcentaje de flores/frutos caídos cada semana respecto al número inicial de flores.



### **Polinizaciones manuales**

Con la finalidad de comparar el cuajado en flores polinizadas y aquellas dejadas a libre polinización, durante el año 2006 se polinizaron 1.067 flores en diferentes inflorescencias distribuidas en diferentes árboles eliminando de la inflorescencia las flores que no se polinizaron. Durante 2007 se polinizaron 597 flores usando una mezcla de polen compuesta de los genotipos ‘Nobel’, ‘Marvel’, ‘Fuerte’ y ‘Lamb Hass’. La obtención del polen se realizó a partir de las anteras de las flores recogidas en el momento de la dehiscencia de las anteras y la mezcla de polen se obtuvo añadiendo el mismo peso de anteras de cada uno de los genotipos. Por otra parte, para comprobar si este método de polinización era efectivo, se seleccionaron 645 inflorescencias en las que se eliminaron todas las flores excepto cuatro, para después polinizar cada flor con un genotipo, y el cruzamiento se anotó en una etiqueta en cada flor.

### **Control del crecimiento del ovario en flores polinizadas y no polinizadas**

Este estudio se llevó a cabo durante los años 2007 y 2008. En el momento de antesis, se emasculó un grupo de flores que se dejó sin polinizar, y se cubrieron con una malla impidiendo el contacto con insectos y así evitar que tuviesen lugar polinizaciones indeseadas, mientras que otro grupo de flores se polinizó manualmente usando polen procedente del cultivar Fuerte. El polen se aplicó por contacto directo de las anteras con el estigma.

Se recogieron un total de 20 pistilos por tratamiento y día durante los 10 días siguientes al momento de antesis el primer año de estudio, y un total de 10 pistilos durante 18 días el segundo año de estudio. Se midió el peso del pistilo y el diámetro de los ovarios.

### **Desarrollo del fruto**

Para estimar el crecimiento del fruto y determinar el tamaño del fruto más sensible a la caída, durante la mitad del mes de mayo se marcaron 200 frutos. En



cada fruto semanalmente se midió la longitud y diámetro usando un calibre Digi-Max slide calliper (Sigma-Aldrich Co, Alemania). Una semana más tarde, solamente 20 frutos permanecían en el árbol, por lo que se volvieron a marcar 200 frutos adicionales. Cada fruto se midió semanalmente y se anotó la fecha de caída durante los primeros meses; posteriormente las mediciones se hicieron aproximadamente cada dos semanas. Conociendo la dinámica de crecimiento de estos frutos se podría predecir el momento en el que el fruto alcanza un tamaño deseable para su recolección.

### **Análisis estadísticos**

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Los porcentajes de cuajado entre las distintas poblaciones de flores se compararon mediante una Chi cuadrado a la que se le aplicó la corrección de Yates por continuidad. Las medias de los tamaños entre los frutos caídos y los retenidos en el árbol se compararon mediante el test de Student.

## **RESULTADOS**

El objetivo primordial de este trabajo era caracterizar, por un lado, el patrón de caída de flores y frutos y, por otro, el efecto de la polinización en este patrón y en el cuajado.

### **Patrón de fructificación**

El proceso de fructificación comienza a partir de la antesis con la apertura de las flores en estado femenino (Figura 1a), que por medio de las abejas recibirá polen procedente de las anteras de una flor abierta en estado masculino (Figura 1b, 1c). Tras la polinización, el ovario comienza a engrosar y se produce una gran caída de flores (Figura 1d) quedando aproximadamente un fruto por

inflorescencia (1e) que, tras 8 meses aproximadamente, alcanzará su estado de madurez.



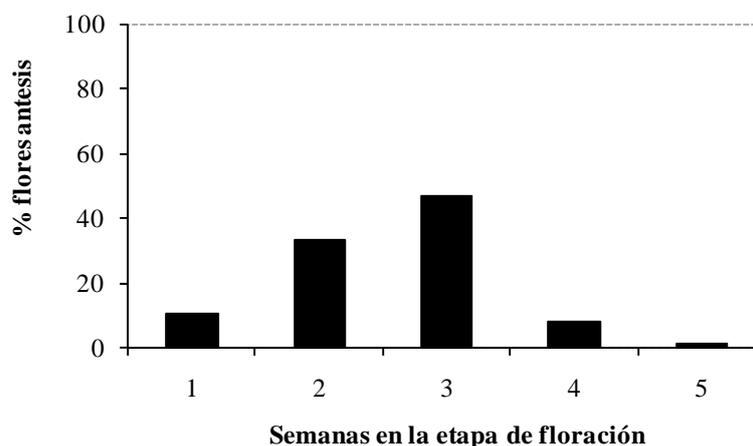
**Figura 1.** Caracterización del proceso de fructificación. **a.** Inflorescencia con flores en antesis. **b.** Abeja recolectando polen en flores en estado masculino. **c.** Abejas polinizando flores en estado femenino. **d.** Flores cuyo ovario ha empezado a engrosar y gran parte de ellas han caído. **e.** Único fruto en desarrollo retenido en la inflorescencia tras la masiva caída de flores/frutos que tiene lugar en el mes posterior a la antesis. **f.** Fruto maduro.

### Caída de flores

El número total de flores de las 500 inflorescencias que se dejaron a libre polinización fue de 12.903. La etapa de floración del cultivar Hass transcurre durante aproximadamente 5 semanas, aunque es durante la segunda y tercera



semana cuando se produce la apertura de la mayoría de las flores; el 33% de las flores abrieron durante la segunda semana y el 47% durante la tercera semana. En la Figura 2 se muestra el porcentaje de flores del cultivar Hass que abrieron durante cada semana de la floración.



**Figura 2.** Porcentaje de flores en antesis en el cultivar Hass durante su etapa de floración.

Durante los dos meses siguientes a la floración tiene lugar una intensa caída de flores y de pequeños frutos en desarrollo. Así, en el año de baja producción de flores (2006), de las 12.903 flores dejadas a libre polinización, solamente 20 se transformaron en frutos siendo el porcentaje de cuajado de 0,16% mientras que en las flores polinizadas manualmente fue de 2,5% (Figura 3a). El número medio de frutos por inflorescencia fue de 0,04, oscilando desde 0 a 2. El patrón obtenido ha sido consistente entre los años de estudio concentrándose la caída en los dos meses posteriores a la fecha de antesis. Durante el segundo año de baja producción (2008), se contaron 4.165 flores dentro de las 12 inflorescencias obteniéndose un porcentaje de cuajado similar al observado en 2006 (0,1%).

La mayor caída de flores se registró desde el momento de antesis hasta la mitad del mes de mayo y fue seguida por una caída de pequeños frutos en desarrollo. Así esta caída se prolonga hasta la mitad del mes de junio. El patrón de caída de flores y frutos ha sido independiente de la polinización, puesto que fue muy similar entre flores polinizadas (Figura 3b) y de libre polinización

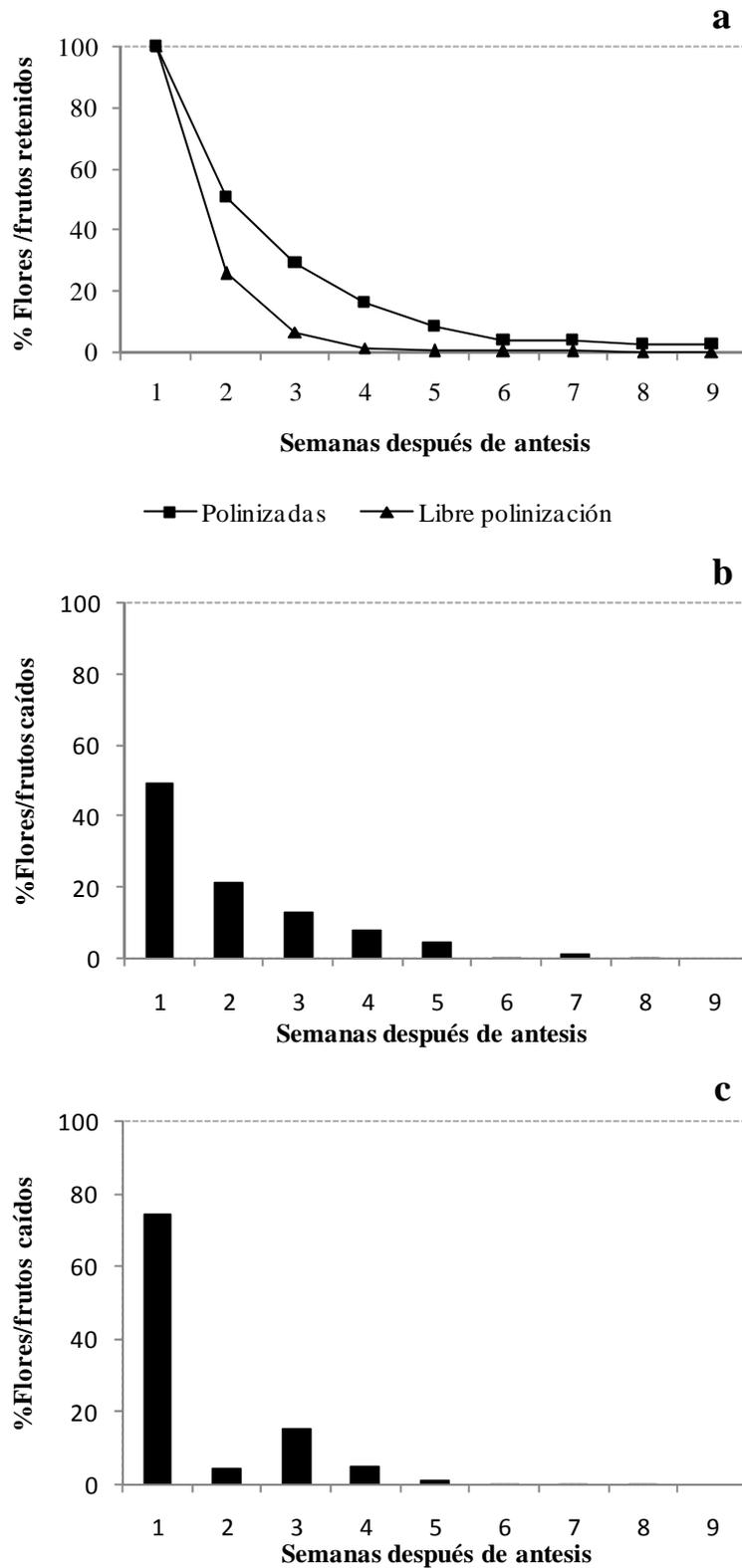


### Capítulo 3

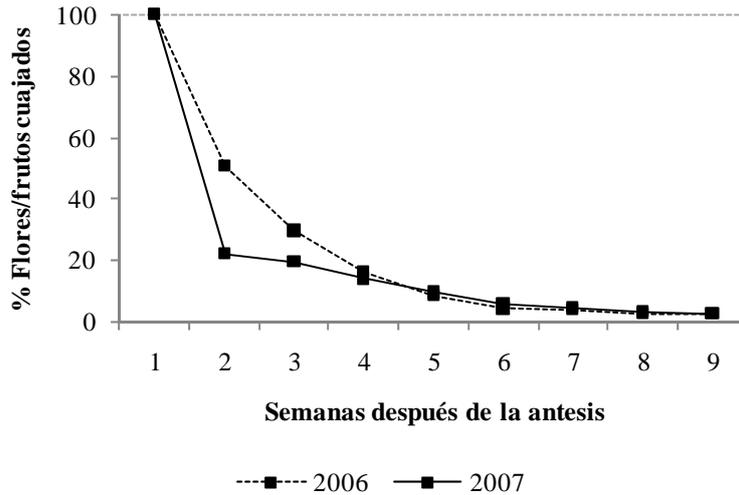
(Figura 3c) concentrándose la mayor caída la semana siguiente a la fecha de antesis.

En el año de alta producción de flores (2007), en aquella población formada por 597 flores que se polinizaron manualmente con la mezcla de polen el porcentaje de cuajado fue de 0,84%, mientras que en las que fueron polinizadas con un único polinizador fue de 1,82%. A pesar de que el porcentaje de cuajado en la población de flores polinizadas fue inferior al polinizar con la mezcla de polen, no se han encontrado diferencias significativas. En el caso de flores polinizadas no se han observado diferencias entre los años de alta y baja producción de flores (Figura 4). Sin embargo, sí que existen tales diferencias entre aquellas flores polinizadas manualmente y aquellas sin polinizar en el año de baja producción ( $p < 0,001$ ).

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en el cuajado basadas en la posición que la flor ocupa dentro de la inflorescencia ni en la fecha de antesis.



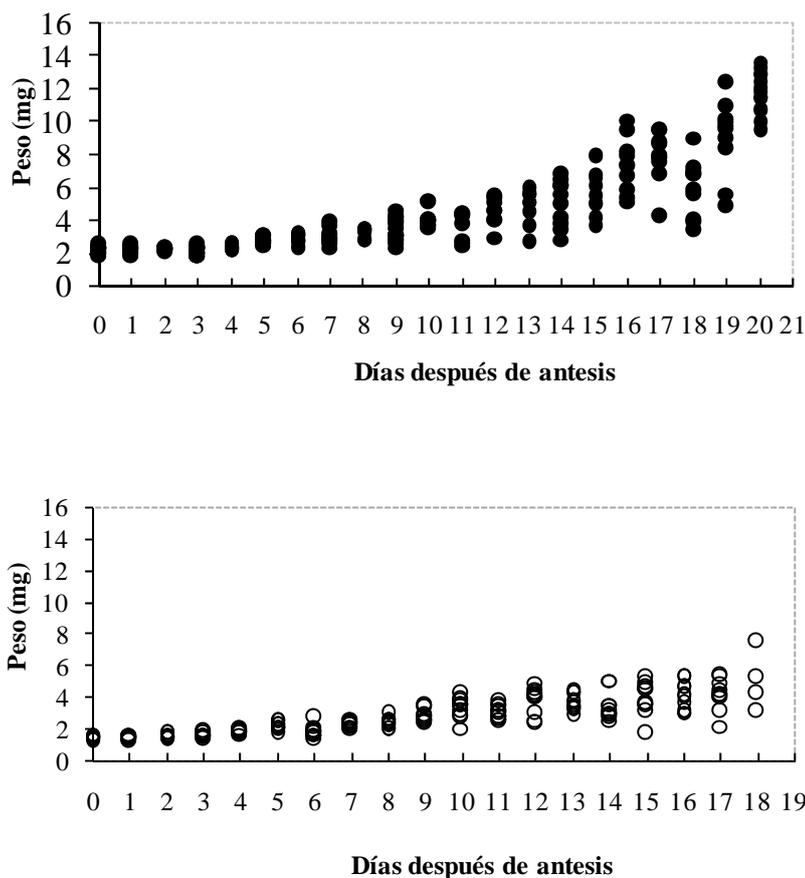
**Figura 3.** Porcentaje de cuajado inicial en flores polinizadas y dejadas a libre polinización en el año de baja producción durante las semanas siguientes a la antesis (a). Porcentaje de caída en flores polinizadas polinización manualmente en el año de baja producción (b) y en aquellas dejadas a libre polinización (c) durante las semanas posteriores a la fecha de antesis.



**Figura 4.** Porcentaje de cuajado inicial en flores polinizadas en los años de alta y baja producción durante las semanas siguientes a la antesis.

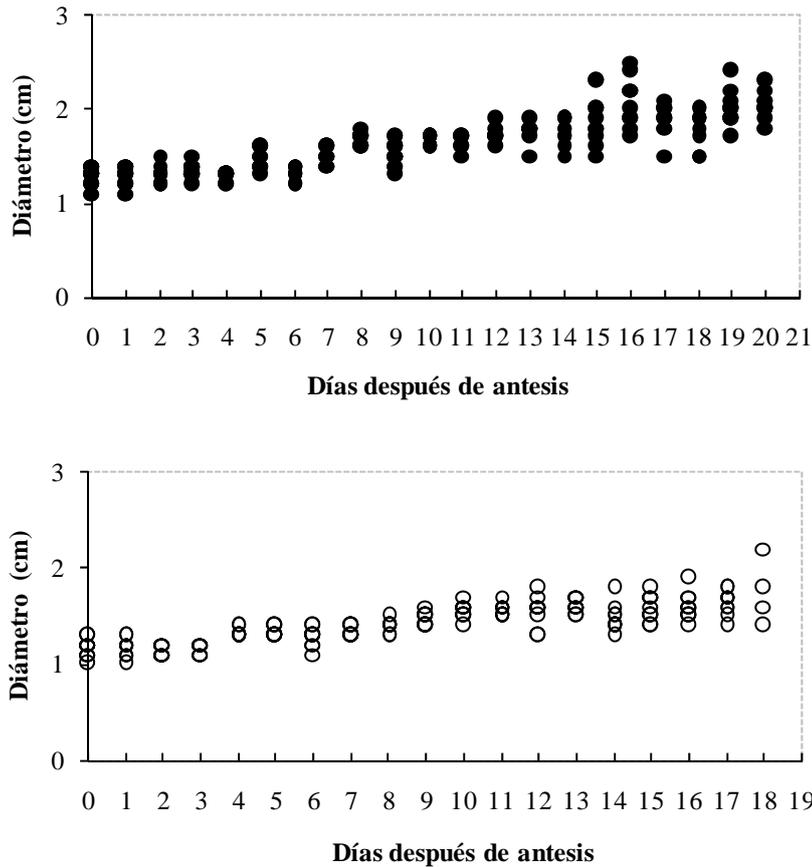
### Crecimiento de flores polinizadas y no polinizadas

El peso fresco de los pistilos polinizadas, el día siguiente a la antesis, osciló desde 1,8 a 2,5 mg con un valor medio de 2,16 mientras que en aquellas flores no polinizadas y emasculadas el peso osciló desde 1,3 a 1,5 con un valor medio de 1,5. En los días posteriores a la antesis, el peso mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones de flores, siendo menor en flores no polinizadas excepto en los días 11 y 12 en el segundo año de estudio. En ambas poblaciones, algunas flores detuvieron su crecimiento y cayeron los días siguientes. Dieciséis días después de la antesis el peso de las flores no polinizadas osciló desde 2,2 a 5,5 con un valor medio de 4,22 mg mientras que las polinizadas presentaron un peso superior oscilando desde 4,2 a 9,4 con un valor medio de 7,81 (Figura 5).



**Figura 5.** Peso de flores polinizadas (●) y no polinizadas (○) en el año 2008 durante los días siguientes a antesis.

En el año 2007 no se observaron diferencias en el peso entre ambas poblaciones de flores durante los siete días siguientes a la antesis. Sin embargo, en este momento las flores polinizadas incrementaron su peso significativamente mientras que las flores no polinizadas lo incrementaron lentamente. En este estudio, se han observado diferencias en base al diámetro de los ovarios en el momento de antesis en flores del mismo cultivar; sin embargo no se han observado diferencias significativas en el diámetro entre ambas poblaciones (Figura 6).



**Figura 6.** Diámetro (cm) en flores polinizadas (●) y no polinizadas (○) durante los días siguientes a antesis en el 2008.

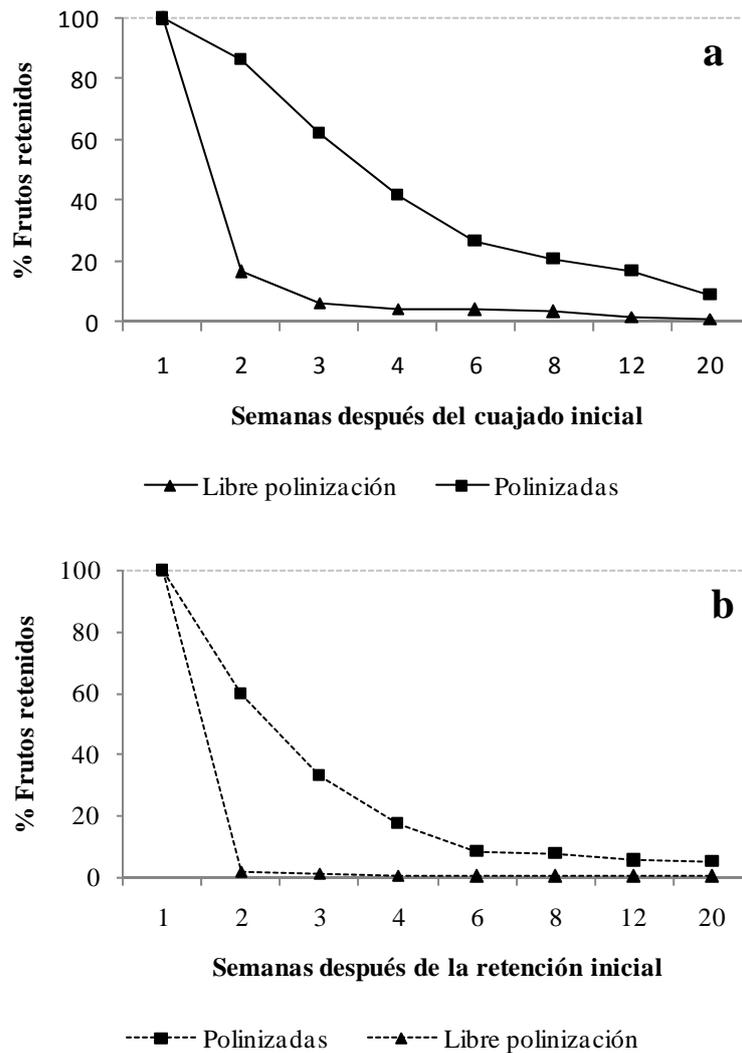
### Caída de frutos

Hasta finales del mes de mayo se produce una gran caída de pequeños frutos en desarrollo, cayendo preferentemente frutos con tamaño inferior a 5 mm.

Tanto en el año de alta producción como en el de baja en flores polinizadas manualmente como las dejadas a libre polinización se determinó la retención final de frutos en base a la retención observada en la segunda semana del mes de mayo. En el año de alta producción se observaron diferencias significativas entre ambas poblaciones ( $p < 0,001$ ) con un porcentaje de 1,25 en las no polinizadas y 9,09 % en las polinizadas (Figura 7a). Cuando se compara la retención final de frutos con respecto a la inicial, en el año de baja producción se observa que en flores dejadas a libre polinización el cuajado final fue del 0,6% y en aquellas polinizadas fue del 5,13% (Figura 7b).



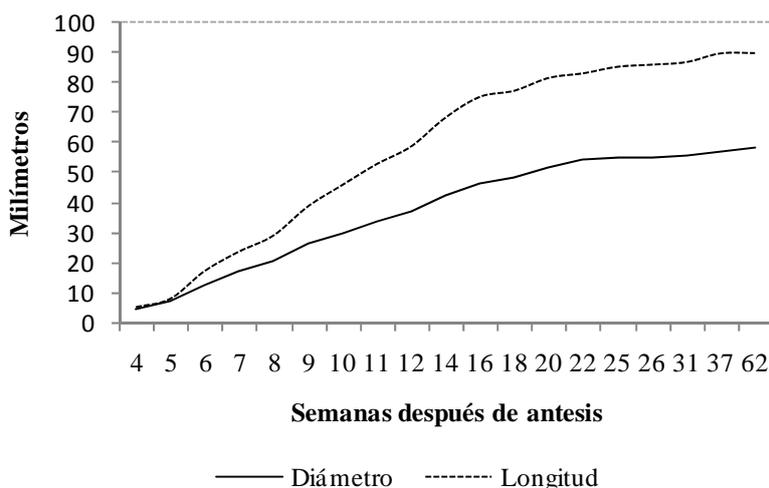
Por otra parte, en cuanto a la caída de frutos inicialmente retenidos en la población de flores polinizadas naturalmente se observaron diferencias en el porcentaje de cuajado entre el año de baja y de alta producción de flores ( $p=0,021$ ) encontrándose mayor cuajado en los años de baja producción; sin embargo tales diferencias no se encontraron en las polinizadas manualmente ( $p=0,604$ ).



**Figura 7.** Porcentaje de frutos retenidos en el árbol con respecto al cuajado inicial en flores polinizadas y dejadas a libre polinización en el año de alta (a) y baja producción (b).

## Crecimiento del fruto

Durante las dos semanas siguientes a la antesis el diámetro y la longitud del fruto muestran valores muy similares; posteriormente los frutos crecen más rápido en longitud que en diámetro (Figura 8). Entre 31 y 37 semanas después de la floración los frutos alcanzan su diámetro y longitud máximos no mostrando variaciones significativas a partir de este momento.



**Figura 8.** Crecimiento en longitud y diámetro de los frutos desde el final de la floración hasta el momento de la recogida.

## DISCUSIÓN

El seguimiento del proceso de reproducción desde la antesis hasta la maduración del fruto nos permitió establecer el patrón de crecimiento y caída de flores y frutos. Así, durante los meses siguientes a la floración tiene lugar una importante caída de flores y de frutos como ocurre en gran cantidad de frutales (Sedgley y Griffin, 1989; Rodrigo y Herrero, 2002; Hedhly et al., 2007). En aguacate no existen diferencias morfológicas aparentes entre las flores que caen y las que son retenidas por el árbol (Sedgley, 1980), aunque se ha descrito que la causa de esta temprana caída es la falta de polinización (Sedgley, 1987) y se ha observado que un gran porcentaje de los frutos en desarrollo que caen tras tres o cuatro semanas de su formación carecen de endospermo o de embrión (Tomer y Gazit, 1979). Sin embargo, en este trabajo se ha puesto de manifiesto que este



patrón de caída es en gran parte independiente del proceso de polinización puesto que muestra gran similitud entre flores polinizadas manualmente y las dejadas a libre polinización. No obstante, el hecho de que en años de baja producción, en flores polinizadas manualmente se haya obtenido una tasa de cuajado quince veces superior que en las dejadas a libre polinización pone de manifiesto la existencia de una polinización deficiente en algunas condiciones. Esta deficiencia de polinización en el campo puede ser explicada por el comportamiento floral que caracteriza al aguacate unido a una posible actuación ineficiente del insecto polinizador o a que su densidad no sea la óptima. El exceso de flores que produce el aguacate podría tener una importante función en la atracción del polinizador (Gutián, 1993) puesto que se ha descrito que estas las flores individuales resultan poco atractivas para las abejas (Vithanage, 1990).

En este trabajo el porcentaje de cuajado obtenido en flores sin polinizar fue similar al descrito previamente por Garner y Lovatt (2008). En las flores polinizadas manualmente, no encontramos diferencias en la tasa de cuajado entre los años de alta y baja producción de flores, por lo que la diferencia de producción entre ambos no se debería a un mayor cuajado sino que va a depender de la producción de flores.

Debido a que el patrón de caída es en gran medida independiente de la polinización es necesario considerar otros factores que limitan la producción. Entre los factores que condicionan el cuajado se deben tener en cuenta las condiciones ambientales (Stephenson, 1992) y, probablemente, propiedades inherentes a la propia flor y al polen. De hecho, el porcentaje de cuajado obtenido en flores polinizadas manualmente con una mezcla de polen fue muy inferior al obtenido al polinizar con flores individuales lo que sugiere que se puede producir una disminución en la viabilidad del polen ocasionada por la manipulación de las anteras.

Por otra parte, para explicar la baja producción en aguacate se ha recurrido a la competencia entre frutos en desarrollo por las reservas nutritivas (Scholefield et al., 1985; Wardlaw, 1990). En el año de alta producción se observó la



### Capítulo 3

existencia de una población de flores que abren al final del mes de mayo, y rara vez cuajan, lo que podría explicarse por el hecho de que estos frutos muestran una serie de desventajas con respecto a los frutos de formación más tempranos en cuanto a la competición por los recursos se refiere (Lee, 1998). A esta competición entre frutos hay que sumar el crecimiento vegetativo que tiene lugar después de la etapa de floración, convirtiéndose estos brotes en un importante sumidero de energía (Whiley, 1990) lo que podría explicar una caída prematura por competencia entre brotes y frutos (Quinlan y Preston, 1971). Al comparar la retención final de frutos con respecto a la inicial en ambas poblaciones entre años de alta y baja producción, se observa que el cuajado es mayor en los años de alta producción lo que podría tener su origen en el tipo de inflorescencia predominante en cada uno de los años. Así, mientras que en el año de baja producción predominaron las inflorescencias indeterminadas, en el año de alta producción lo hicieron las determinadas. De este modo, se ha descrito que una reducción en el crecimiento vegetativo incrementa la producción (Bertling y Köhne, 1986; Köhne y Kremer-Köhne, 1987), aunque por otra parte se ha sugerido que estas inflorescencias indeterminadas podrían aportar ventajas para el cuajado puesto que inducirían un mayor movimiento de nutrientes desde el xilema (Blanke y Lovatt, 1996). Así, en nuestro caso, podría existir una competencia entre frutos que se vería afectada negativamente por el crecimiento vegetativo que tiene lugar en las inflorescencias indeterminadas aumentando la caída de los frutos retenidos inicialmente. Además, el hecho de que la caída inicial de flores ocurra en el año de baja producción durante las tres semanas siguientes a la fecha de antesis de forma más paulatina, mientras que en el año de alta producción una alta proporción lo hace durante la semana siguiente, corrobora la idea de la competencia con el desarrollo vegetativo del árbol puesto que hasta pasados 17 días de la emergencia, las nuevas hojas no tienen capacidad fotosintética, convirtiéndose en una importante competencia por los recursos (Wolstenholme, 1990; Liu et al., 1999).

En aquellos frutales en los que las reservas nutritivas juegan un importante papel determinando la producción, se ha dado especial importancia a la posición



que la flor ocupa dentro de la inflorescencia e incluso a su momento de apertura (Stephenson et al., 1988; Stephenson, 1992); así en especies con inflorescencias acropétalas, la probabilidad de cuajado aumenta en las flores terminales (Salomon, 1988) mientras que en inflorescencias basipétalas es mayor en las distales (Brunet, 1996). En aguacate al contrario que en especies como *Prunus mahaleb* (Guitián, 1994), no hemos observado correlación entre la posición que la flor ocupa dentro de la inflorescencia y la fecha en la que abre con la capacidad de cuajado. Esta carencia de correlación puede ser debido a que en aguacate no se puede establecer un patrón de apertura de las flores en función de su posición.

La caída masiva de flores se continúa con una abscisión de frutos en desarrollo, siendo los frutos más pequeños los que mostraron una mayor sensibilidad a la caída. En trabajos anteriores se ha descrito que el aborto de estructuras reproductivas así como de pequeños frutos en desarrollo es un fenómeno extendido en las plantas (Lloyd, 1980; Stephenson, 1981) y en aguacate podría ser considerado como un mecanismo que combina un año de producción excesiva de flores con bajo desarrollo vegetativo y otro de baja producción de flores en el que el desarrollo vegetativo adquiere gran importancia.

En base al incremento obtenido en el cuajado en flores polinizadas manualmente con respecto a aquellas dejadas a libre polinización, el primer factor limitante con el que nos encontramos bajo nuestras condiciones de cultivo es la deficiencia en el proceso de polinización. Probablemente este cuajado diferencial podría explicarse por una caída selectiva de frutos (Degani et al., 1986, 1990; Goldring et al., 1987) de tal forma que, aquellos frutos obtenidos mediante libre polinización procederían mayoritariamente de procesos de autofecundación. Previamente se ha observado que determinados genotipo polinizadores confieren una serie de ventajas para la supervivencia de su descendencia (Degani et al, 1989; 1990, 1994, 1997, Goldring et al., 1987). Los resultados obtenidos indican, sin embargo, que a pesar de la dicogamia



### Capítulo 3

protogínica la mayor parte de los frutos maduros son resultado de autofecundación, lo que podría explicar la producción obtenida en parcelas monovarietales.

Sin embargo, a pesar de las polinizaciones manuales, el cuajado continúa siendo bajo por lo que todo apunta a la existencia de otros factores limitantes. Por otra parte, el hecho de que el cuajado sea mayor en los años de baja producción de flores que en aquellos de alta producción, hace pensar que la densidad de las abejas juega un papel de gran relevancia en este cuajado, puesto que al aumentar considerablemente el número de flores disminuye la probabilidad de que sean visitadas por las abejas. Teniendo en cuenta este factor sería interesante aumentar la densidad de estos polinizadores preferentemente durante la segunda y tercera semana de la etapa floración puesto que es durante este tiempo cuando abren la mayor parte de las flores.

La caída de flores y frutos inmaduros podría ser debida a un mecanismo encaminado a evitar que todas las flores se transformen en fruto, especialmente en especies como el aguacate que produce frutos de altos requerimientos energéticos. La inversión de los árboles en producir un elevado número de flores y de pequeños frutos en desarrollo que no podrán transformarse en frutos maduros es un fenómeno común en algunos frutales de hoja perenne (Stephenson, 1981). Sin embargo, las causas son desconocidas, aunque probablemente podría ser considerado como un mecanismo que asegura el cuajado debido a que las flores pueden funcionar como reservas de ovario (Ehrlén, 1981) puesto que toda la fase progámica y el posterior cuajado muestran una alta susceptibilidad a las condiciones ambientales.

No obstante, todavía se desconoce el motivo por el cual unas flores se desprenden mientras que otras se mantienen en el árbol (Charlesworth, 1989). Los resultados de este trabajo muestran que la polinización es un proceso indispensable para la transformación de la flor en fruto, siendo el primer factor limitante del cuajado. Sin embargo, resulta imprescindible el conocimiento de lo que ocurre durante la fase progámica así como la comprensión de las



implicaciones de las reservas nutritivas en el proceso del cuajado para elucidar los cuellos de botella que condicionan el cuajado final en aguacate.





## **4 RESERVAS DE ALMIDÓN EN EL OVARIO Y PROCESO REPRODUCTIVO EN AGUACATE**

### **INTRODUCCIÓN**

En aguacate, sólo una pequeña proporción de las flores que se producen llegan a convertirse en fruto debido a que acontece una caída masiva de flores y frutos en desarrollo (Cameron et al., 1952; Garner y Lovatt, 2008). Numerosos factores se han sugerido como posibles causas de la baja tasa de cuajado de esta especie, entre los que se incluyen las temperaturas extremas (Sedgley, 1977; Sedgley y Annells, 1981; Sedgley, 1987), la tasa de fecundación cruzada (Degani et al., 1989; 1990; 1997), la alternancia productiva (Hodgson y Cameron, 1935; Hodgson, 1946), una polinización insuficiente (Sedgley, 1987) o deficiencias nutritivas (Embleton et al., 1959; Whiley, 1994; Lahav y Zamet, 1999b). Sin embargo, estos factores no explican la causa por la que la mayoría de las flores caen prematuramente mientras que otras son retenidas en el árbol (Garner et al., 2008).

Diferentes estudios llevados a cabo en varias especies sugieren que el cuajado está relacionado con las provisiones de fotoasimilados acumulados en la planta (Guin, 1974; Kinet, 1977; Wien et al., 1989; Aloni et al., 1996) y que los acontecimientos que ocurren entre la polinización y el desarrollo inicial de los frutos dependen en gran medida del almidón existente a diferentes niveles del pistilo (Herrero y Dickinson, 1979; Arbeloa y Herrero, 1991; Rodrigo y Herrero, 1998; Rodrigo et al., 2000; Lebon et al., 2004; Rodrigo et al., en prensa). En especies leñosas, los carbohidratos necesarios para el desarrollo de las flores y de los frutos proceden de las reservas que el árbol ha acumulado durante el año anterior y de la fotosíntesis que tiene lugar en flores y hojas.

En algunas especies leñosas cuya producción se ve limitada por la alta abscisión de frutos, esta caída se ha interpretado como un mecanismo de ajuste entre la producción de frutos y la disponibilidad de carbohidratos en el árbol



(Goldschmidt y Monseline, 1977; Guardiola, 1988), siendo el contenido de azúcar del fruto el principal factor desencadenante de este mecanismo en cítricos (Mechouachi et al., 1995). La disponibilidad de nutrientes en el árbol podría limitar la producción por diferentes vías. Una de ellas sería limitando el número de flores, ya que se ha establecido una correlación entre el contenido de almidón en la madera y en las yemas con el número de flores por inflorescencia (Bennet et al., 2002; Duchêne et al., 2003). Otra forma de limitación de la producción es la caída de flores y frutos. Así, se ha establecido una correlación inversa entre el contenido de carbohidratos de la planta y el aborto de órganos florales (Wien et al., 1989; Aloni et al., 1996), de tal forma que niveles bajos de carbohidratos se corresponden con porcentajes altos de abscisión de frutos (Stephenson, 1981; Guitián, 1994; Mehouchi et al., 1995; Gómez-Cadenas et al., 2000; Jean y Lapointe, 2001). Además, en plantas leñosas, los órganos vegetativos y reproductivos compiten por los recursos (Wardlaw, 1990).

Las flores en desarrollo necesitan carbohidratos desde el estado de iniciación floral (Yu et al., 2000) hasta la maduración de los órganos florales (Clement et al., 1996; Rodrigo et al., 2000; Niewiadomski et al., 2005). Aloni et al. (1996) sugirieron que la capacidad de la flor para acumular carbohidratos es un factor determinante en la retención de las flores y en la subsecuente fructificación. En otros trabajos se ha puesto de manifiesto que la caída de frutos está causada por una limitación de carbono (Jean y Lapointe, 2001); así, los carbohidratos almacenados en el pistilo podrían ser importantes para el desarrollo inicial del fruto y para asegurar su retención en el árbol (Rodrigo et al., 2000). El almidón juega un importante papel en el éxito reproductivo (Herrero, 1992; Herrero y Hormaza, 1996) y es el componente de reserva más importante tanto en especies leñosas (Chapin et al., 1990) como en herbáceas (Herrero y Dickinson, 1979; Aloni et al., 1996). Durante la fase progámica, el almidón acumulado en el pistilo se usa como fuente nutritiva para diferentes procesos. En esta fase, el pistilo es una estructura activa que permite la germinación del polen en el estigma y el crecimiento del tubo polínico hacia el óvulo, proporcionando un ambiente idóneo tanto nutricional como direccional para que la fecundación



tenga lugar (Herrero y Hormaza, 1996; Herrero, 2000; Herrero, 2003). Desde la polinización a la fecundación, el almidón acumulado en el pistilo es requerido como una fuente nutritiva en diferentes momentos. En especies con estigma húmedo, el almidón se va movilizándolo de las papilas estigmáticas al mismo tiempo que se produce la secreción estigmática, facilitando la hidratación, germinación y el crecimiento inicial del tubo polínico. Inicialmente, el crecimiento del tubo es autótrofo, ya que se desarrolla a expensas de sus propias reservas (Herrero y Dickinson, 1981). En el estilo, el crecimiento del tubo es heterótrofo, ya que se produce a partir de las reservas previamente acumuladas en el tejido transmisor del estilo (Herrero y Dickinson, 1979). El almidón acumulado en el ovario está implicado en el destino del óvulo (Rodrigo y Herrero, 1998) y en el cuajado (Rodrigo et al., 2000). La acumulación de gran cantidad de almidón durante el desarrollo del óvulo juega un papel de gran importancia como fuente nutritiva en los procesos de fecundación y durante la embriogénesis en diferentes especies como en el género *Gasteria* (Willensen y Franssen-Verheijen, 1983) y en *Spiria olearacea* (Wilms, 1980) así como en el desarrollo del cigoto (Sornsathapornkul y Owens, 1999).

Se han descrito diferencias en cuanto al contenido de almidón del óvulo entre flores de cultivares con diferentes tasas de abscisión de flores, presentando mayor contenido de almidón las flores de los cultivares con menor tasa de caída de flores (Lebon et al., 2004) e incluso entre flores del mismo genotipo (Rodrigo et al., 2000). Esto también podría deberse a otras funciones de los azúcares además de la de fuente energética, como por ejemplo su papel regulador en la expresión génica así como su funcionamiento como moléculas diana en las respuestas frente a situaciones de estrés (Lebon et al., 2008).

En aguacate, se ha descrito la presencia de almidón en el ovario en el momento de la antesis (Sedgley, 1979); sin embargo, no se han analizado las implicaciones de las reservas de almidón de la flor en la fase reproductiva. La alternancia productiva es un fenómeno común en aguacate y trabajos anteriores han sugerido que se debe a una mayor concentración de reservas de almidón en



las ramas durante el invierno previo a años de alta cosecha que en años de baja cosecha (Scholefield et al., 1985; Van der Walt et al., 1993; Lovat, 2005). Esto sugiere que la alternancia productiva guarda una estrecha relación con las reservas de carbohidratos del árbol y, por lo tanto, el estado nutritivo del árbol podría ser determinante en la fructificación (Scholefield et al., 1985).

En aguacate, el crecimiento reproductivo y vegetativo ocurre simultáneamente y por lo tanto ambos compiten por los recursos procedentes bien de la movilización de las reservas o de la fotosíntesis (Blumenfield et al., 1983; Scholefield et al., 1985; Wardlaw, 1990). En otras especies se ha sugerido que esta competición puede ser importante determinando la retención de las flores (Aloni et al., 1991).

Para explorar las implicaciones de las reservas nutritivas de la flor en relación al cuajado en aguacate, en este trabajo se ha evaluado el contenido de almidón en flores individuales. Aunque se han usado ampliamente métodos de extracción de carbohidratos y otros métodos analíticos para medir cambios en el contenido de almidón, se encuentran limitados debido a que las reservas de almidón se encuentran compartimentadas en pequeñas porciones de tejidos y se requieren grandes cantidades de tejido para su aplicación dificultando la detección de diferencias en el contenido de almidón entre flores (Herrero y Dickinson, 1979; Brun y Betts, 1984; Arbeloa y Herrero, 1991; Rodrigo y Herrero, 1998; Rodrigo et al., 2000; en prensa). El desarrollo de un sistema de análisis de imagen acoplado al microscopio (Rodrigo et al., 1997) permite evaluar cambios en pequeñas estructuras y la detección de diferencias entre flores.

Para establecer si el estado nutritivo de la flor en anthesis está relacionado con el proceso reproductivo en aguacate, se ha caracterizado el contenido de almidón en el ovario en flores individuales en anthesis y su evolución en los días posteriores en dos años consecutivos, uno de alta y otro de baja producción. Con el fin de dilucidar si este proceso es promovido por la polinización o forma parte de un programa intrínseco de desarrollo de la flor, las observaciones se han



realizado en flores polinizadas y en flores sin polinizar. A continuación, se ha evaluado el contenido de almidón en flores de dos poblaciones con diferente capacidad de cuajado, las inflorescencias tempranas que normalmente producen fruto y las inflorescencias tardías improductivas. Finalmente, se ha analizado el estado nutritivo de la flor en antesis en flores que llegan a fruto y en flores que se desprenden del árbol antes de cuajar. Para ello, se ha seccionado el estilo de flores polinizadas una vez que los tubos polínicos han llegado al ovario, de forma que se ha evaluado el contenido de almidón de cada estilo y se ha relacionado con la posterior abscisión o cuajado del ovario que permaneció en el árbol.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Establecimiento de las poblaciones de flores**

Se seleccionaron tres árboles de aguacate (*Persea americana* Mill.) del cv Hass mantenidos en la E.E. La Mayora y se eligieron un mínimo de 30 inflorescencias en cada árbol. Durante la etapa de floración se anotó la fecha de apertura de cada flor, el número de inflorescencia y su posición dentro de la inflorescencia. Las flores se recogieron en el momento de antesis.

El primer ensayo se fundamenta en el hecho de que el cultivar Hass combina un año de alta producción con otro de baja; por este motivo, se analizó y comparó el estatus nutritivo de 70 flores en un año de baja producción (2006) y de 90 flores de otro de alta producción (2007). Para ello, se emasculó un grupo de flores en antesis que se dejaron sin polinizar y se cubrieron con una malla, impidiendo el contacto con insectos y evitando así polinizaciones no deseadas. Otro grupo de flores se polinizaron manualmente con polen procedente del cultivar 'Fuerte'. El polen se aplicó por contacto directo de las anteras dehiscentes con el estigma de las flores emasculadas. Se recogieron un total de 20 pistilos por tratamiento y día durante los 10 días siguientes al momento de antesis.



En el segundo ensayo, se analizaron flores de inflorescencias con diferente capacidad de cuajado. Para ello, se recogieron 90 flores en anthesis de inflorescencias tempranas que normalmente producen frutos y 30 flores de inflorescencias tardías que abren a mitad o finales del mes de mayo y que normalmente no producen frutos.

En el tercer ensayo, se marcaron 45 inflorescencias distribuidas en los tres árboles. Durante la floración, se polinizaron manualmente unas 40 flores por día hasta un total de 597 flores, que fueron etiquetadas individualmente con la fecha en que fueron polinizadas. En cada inflorescencia se eliminaron las flores abiertas en estado femenino que no se habían polinizado. La polinización se realizó por contacto directo del estilo con las anteras dehiscentes de las flores de 'Fuerte'. Al día siguiente de la polinización, cuando las flores abrieron en estado masculino y el tubo polínico había crecido a lo largo del estilo, a estas flores se les cortaron los estilos y se fijaron en FAA de forma similar a como se ha realizado en un trabajo previo en albaricoquero (Rodrigo et al., en prensa) para su posterior observación al microscopio. Cada estilo fue marcado identificando perfectamente la flor de la que procedía para poder establecer una posible correlación entre contenido de almidón y éxito reproductivo de cada ovario.

Para relacionar las observaciones microscópicas del estilo con el comportamiento del ovario que permaneció en el árbol, se realizaron seguimientos de caída semanales desde el final de la floración hasta la maduración. Así, en el momento en el que los frutos alcanzaron la madurez se conocía el éxito reproductivo de cada flor, y se examinaron los estilos previamente fijados procedentes tanto de aquellas flores que habían cuajado como aquellas que habían caído prematuramente.

Para estimar el posible efecto del corte del estilo en el cuajado, se comparó el cuajado obtenido en este ensayo con el obtenido tras polinizar 645 flores manualmente usando el mismo polen. La tasa de caída en ambos casos se calculó como el porcentaje de frutos caídos respecto al número inicial de flores.



## Preparaciones para el microscopio

Las flores recogidas en el campo y los estilos cortados se fijaron en FAA (70% etanol: ácido acético glacial: formalina [18:1:1; v/v/v]) (Johansen, 1940), se deshidrataron en una serie de alcohol butílico terciario (70, 85, 95 y 100%) y finalmente se incluyeron en parafina. Una vez incluido el material en parafina, se cortó a 10  $\mu\text{m}$  usando un micrótomo de rotación Shandon AS325 (Shandon, UK), posteriormente se desparafinaron y rehidrataron lavando tres veces en HistoClear II (CellPath, Hemel, UK), una en HistoClear II: etanol (1:1 v/v), en una serie de alcoholes (100%, 70%, 40% v/v) y finalmente en agua destilada. Las muestras se observaron en un microscopio óptico tras teñirse usando la reacción de yoduro potásico ( $\text{I}_2\text{KI}$ ) durante 5 minutos (Johansen, 1940) y se observaron en un microscopio Leitz Ortholux II (Leitz, Wetzlar, Alemania).

## Análisis de imagen y evaluación del contenido de almidón

El procedimiento de evaluación del contenido de almidón en secciones de flores se basa en la medida de la densidad óptica de la imagen obtenida con el microscopio usando el método descrito por Rodrigo et al. (1997) con modificaciones. Después de la tinción con  $\text{I}_2\text{KI}$ , los gránulos de almidón se distinguen al microscopio claramente del resto de la preparación. Las imágenes obtenidas en el microscopio se capturaron usando un analizador de imagen Quantimet 570 Image Analysis System (Leica, Cambridge, Reino Unido). El sistema identifica cada color como la combinación de tres colores: rojo, verde y azul. La combinación de colores correspondiente al almidón se determinó aumentando manualmente el nivel de cada color hasta que la imagen binaria obtenida (máscara) en la imagen digitalizada reflejaba únicamente el almidón observado al microscopio. Estos niveles fueron almacenados para su utilización en todas las medidas. En cada campo, la máscara obtenida a partir de estos niveles se superpuso sobre la imagen original en blanco y negro, de forma que el sistema mide exclusivamente la densidad óptica de los píxeles de la imagen que quedan cubiertos por las máscaras, que son los correspondientes al almidón



teñido en la preparación. La suma de la densidad óptica de cada pixel se consideró como el valor correspondiente al contenido de almidón del campo medido.

Para analizar una posible correlación entre el contenido de almidón existente en diferentes tejidos del pistilo, se recogieron al azar 150 de las flores fijadas en el primer ensayo que ocupaban diferentes posiciones dentro de la inflorescencia y con distinta fecha de antesis. En cada flor, el contenido de almidón se evaluó en diferentes estructuras: en la parte inferior del ovario (en la sección en la que el óvulo presentaba mayor superficie), en la superior (en la sección en la que el óvulo presentaba menor superficie), a diferentes niveles del óvulo (el tejido cortical, integumentos y nucela), en el tejido cortical del estilo y en el tejido transmisor. En cada región se tomaron cuatro medidas en campos de una superficie de  $1337 \mu\text{m}^2$  cada uno, excepto en la nucela que se midieron cinco campos y en el tejido transmisor que se midió sólo uno. En cada estructura se calculó el valor medio de los campos medidos. Ya que se encontró una correlación positiva entre el contenido de almidón entre las distintas estructuras de la misma flor, se tomaron como medidas representativas para la evaluación del contenido de almidón de cada flor tres regiones: la parte inferior del ovario, la parte superior del ovario y el estilo.

### **Determinación del tamaño del ovario**

Para establecer una posible correlación entre el tamaño de ovario y el contenido de almidón de cada flor, se estimó el tamaño del estilo y del ovario a partir de las mismas preparaciones utilizadas previamente para evaluar el contenido de almidón. Para ello, las preparaciones, sin teñir, fueron observadas en una lupa binocular Wild Heerbrugg M8 (Wild Heerbrugg, Heerbrugg, Suiza) y las imágenes se captaron usando el mismo analizador de imagen. El tamaño del ovario se determinó midiendo la superficie, anchura y longitud de la sección superior.



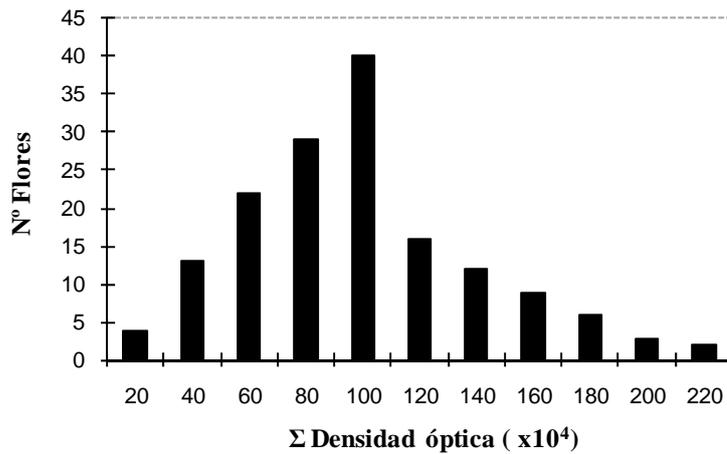
## **Análisis estadísticos**

Los análisis de los datos se llevaron a cabo usando el programa estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Los datos fueron sometidos a un análisis de la varianza (ANOVA). Antes del ANOVA, los datos fueron normalizados usando el test de Kolmogorov-Smirnoff's y se aplicó el test de homogeneidad de varianza con el test de Levène. Cuando el ANOVA mostró valores  $F$  significativos, la separación de las medias se llevó a cabo con el test de Duncan. Las correlaciones entre el contenido de almidón de los distintos tejidos se realizaron usando el estadístico de Pearson con un nivel de significación del 1%. La comparación de medias entre poblaciones se llevó a cabo con el test de Student con un nivel de significación del 5%.

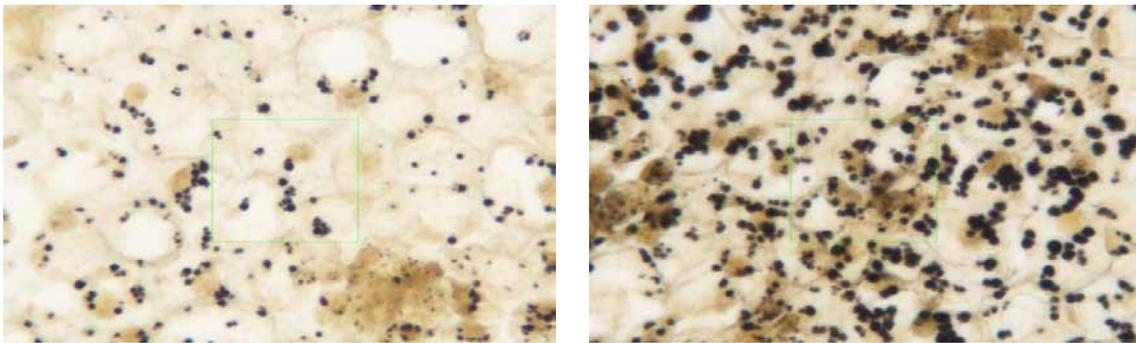
## **RESULTADOS**

### **Contenido de almidón en flores en antesis**

A pesar de que no se observaron diferencias externas entre flores, se encontró una amplia variabilidad en el contenido de almidón en las flores en el momento de la apertura, existiendo diferencias de hasta 1.000 veces en el contenido de almidón entre flores. Así, el contenido de almidón en el ovario osciló desde un valor mínimo de densidad óptica de 6.423 hasta un máximo de 2.333.791 con un valor medio de 911.734 (Figuras 1 y 2).

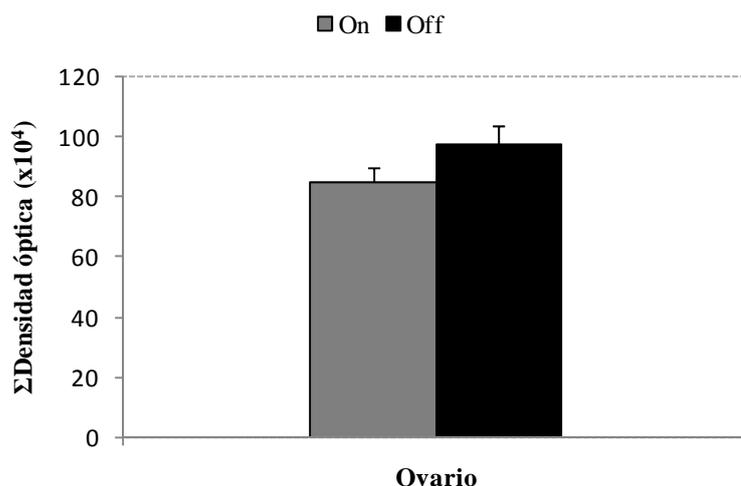


**Figura 1.** Distribución de las flores del cultivar Hass en función de su contenido de almidón en el ovario en el momento de antesis.



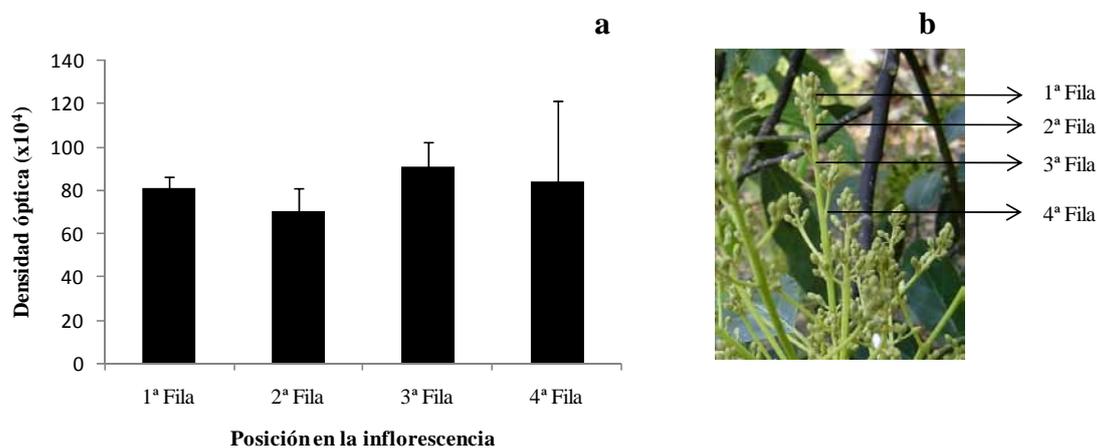
**Figura 2.** Sección transversal de la parte superior del ovario en dos flores en antesis. Esta imagen muestra que las diferencias en el contenido de almidón pueden ser detectadas usando un microscopio óptico.

No se observaron diferencias significativas ( $p=0,08$ ) en el contenido de almidón entre años de alta y baja producción en los que el contenido de almidón estimado fue de 885.921 y 974.228 respectivamente (Figura 3).



**Figura 3.** Contenido de almidón en el ovario en flores recogidas en un año de alta producción (*On*) y en uno de baja producción (*Off*).

En ambos años, no se observaron diferencias en el contenido de almidón entre flores en relación a la posición ( $p=0,1$ ) que ocupaban dentro de la inflorescencia (Figura 4). Se observó una gran variabilidad en el tamaño del ovario entre flores, aunque no se estableció correlación con el contenido de almidón (Pearson= 0,135; con un valor de significancia de 0,318).

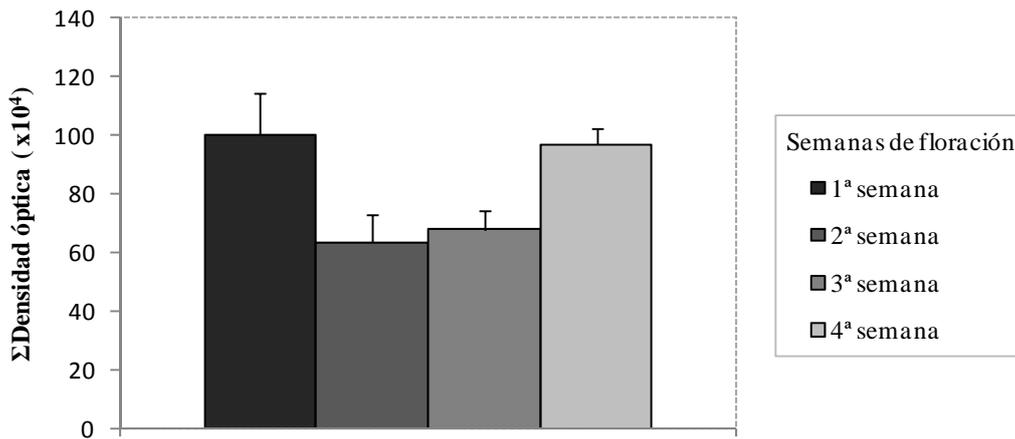


**Figura 4.** (a) Contenido de almidón en el ovario en flores situadas en distinta posición dentro de la inflorescencia durante los dos años de estudio. (b) Esquema de la posición que ocupan las flores dentro de la inflorescencia; incluyéndose en la cuarta fila las flores que se encuentran en posiciones inferiores.

Por otra parte, se detectaron diferencias en el contenido de almidón en base a la fecha de apertura en las flores colectadas durante el año de alta

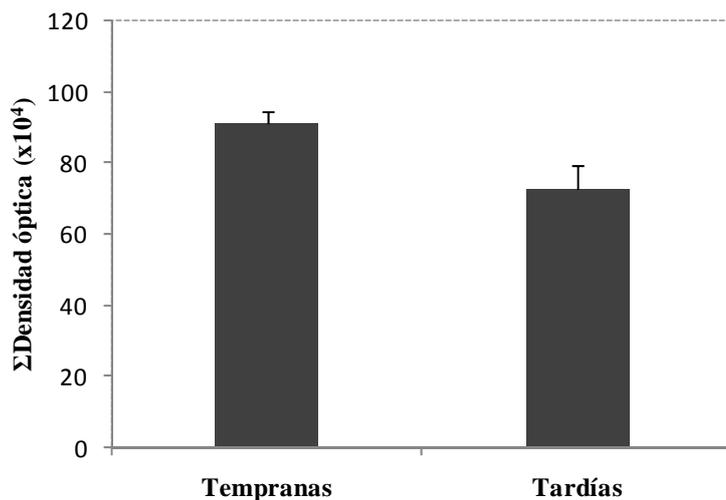


producción (año *On*) (Figura 5). Así, aquellas flores que abrieron durante la primera y la última semana del periodo de floración presentaron mayor contenido de almidón que aquellas que abrieron durante la segunda y la tercera, coincidiendo con el momento de plena floración ( $p=0,03$ ). Sin embargo, estas diferencias no se encontraron en el año de baja producción (año *Off*).



**Figura 5.** Contenido de almidón en el ovario en flores de distinta época de floración en el año de alta producción de flores.

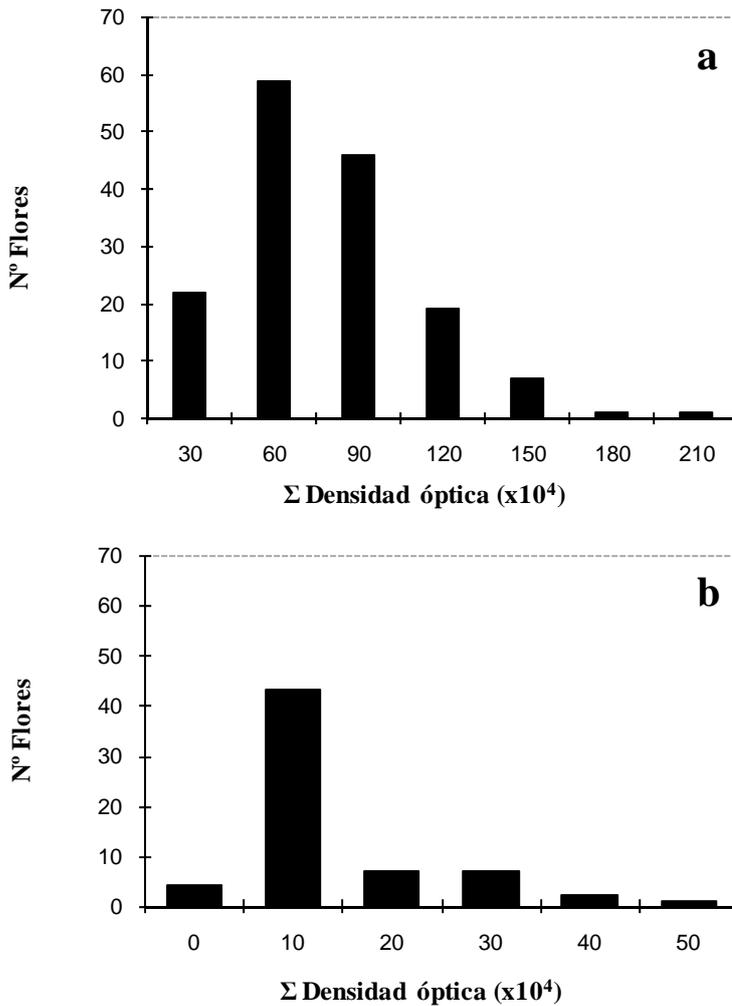
El contenido de almidón en el ovario se midió también en dos poblaciones de flores con diferente capacidad de cuajado resultando significativamente superior ( $p=0,03$ ) en flores tempranas (930.074) que en flores tardías (682.994) (Figura 6). Esta última población de flores normalmente no se transforma en frutos.



**Figura 6.** Contenido de almidón en el ovario de dos poblaciones de flores con distinta capacidad de cuajado: tempranas y tardías.

### **Almidón en el estilo**

Al igual que en el ovario, se observó una gran variabilidad en el contenido de almidón en el estilo entre las flores analizadas en el momento de antesis (Figura 7), encontrando algunas flores que presentaron hasta 1.000 veces más almidón que otras; así, la densidad óptica osciló entre 1.866 y 1.843.127. El almidón acumulado en el estilo disminuyó en ambas poblaciones durante los dos días posteriores a la antesis y a partir del tercer día el contenido de almidón fue mínimo.



**Figura 7.** Distribución de flores del cultivar Hass en base a su contenido de almidón en el estilo en el momento de antesis (a) y al día siguiente de la antesis (b).

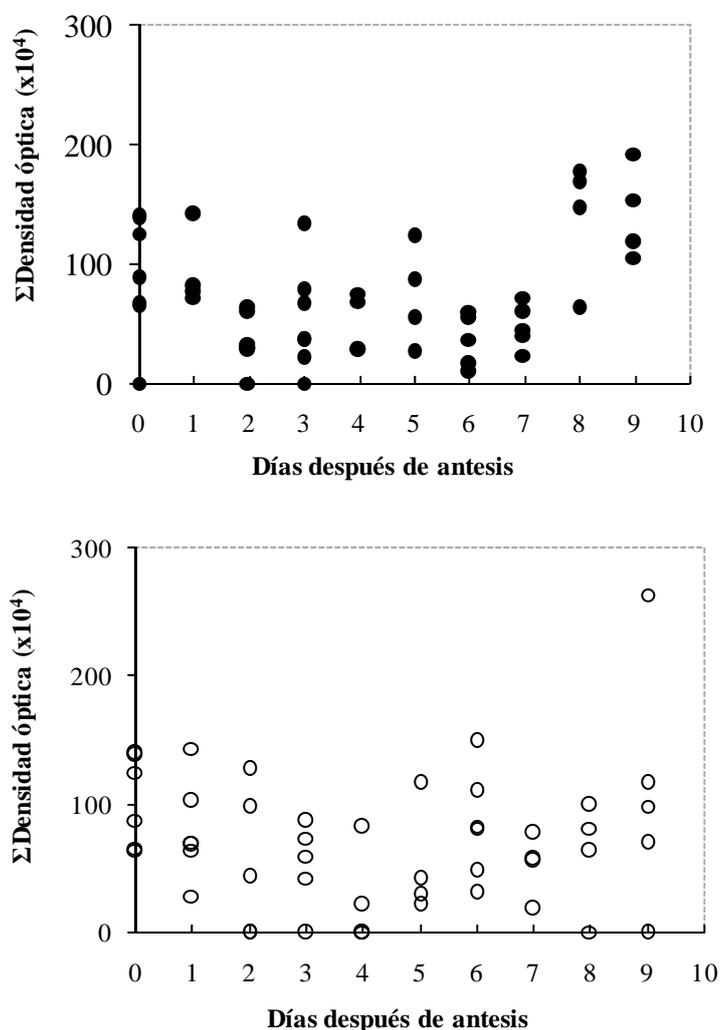
### **Evolución del contenido de almidón en el ovario en los días posteriores a antesis**

Durante las dos semanas siguientes a la antesis, sólo se pudo recuperar el 34% de las flores no polinizadas (66% cayeron), mientras que en la población de flores polinizadas se pudo recolectar el 66% de las flores polinizadas (34% cayeron), por tanto la caída de flores no polinizadas tuvo lugar mayoritariamente en los días posteriores a la antesis.

En el momento de antesis existe una gran variabilidad en el contenido de almidón. Éste continúa acumulándose gradualmente durante los días siguientes a la antesis tanto en flores polinizadas como en aquellas no polinizadas, no



detectándose diferencias significativas entre ambas poblaciones de flores durante los 9 días siguientes a antesis (Figura 8).



**Figura 8.** Variación en el contenido de almidón en la parte superior del ovario durante los nueve días siguientes a la antesis en flores polinizadas (●) y no polinizadas (○) en el año 2007.

### Contenido de almidón en el ovario y en el estilo

Con la finalidad de analizar la influencia de las reservas nutritivas en el destino de la flor resultaba indispensable establecer una correlación entre el contenido de almidón del estilo y el contenido del ovario. De esta forma, con el método de cortar los estilos tras permitir el crecimiento del tubo polínico a lo largo de ellos, se podría estudiar las implicaciones de las reservas nutritivas de las flores en el destino del óvulo que permanecía en el árbol.



En este trabajo, el contenido de almidón del ovario mostró una estrecha correlación con el que existía en el estilo con un nivel de significancia del 1% (Tabla 1).

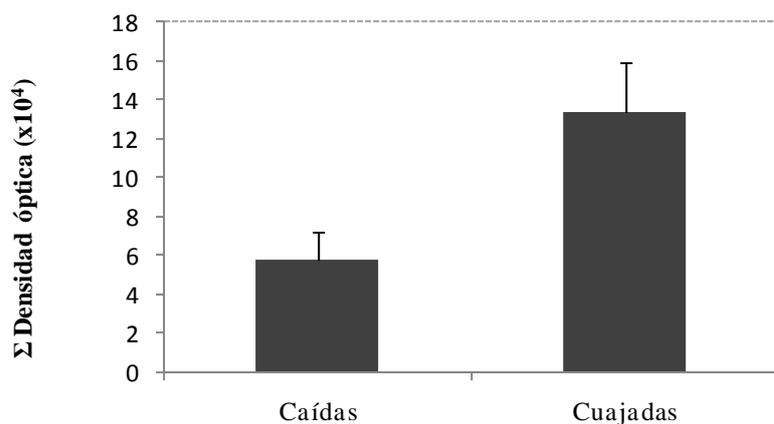
**Tabla 1.** Correlación entre el contenido de almidón existente en el tejido cortical del estilo y en diferentes tejidos del pistilo.

		<b>Estilo (Pearson)</b>
<b>Ovario sección superior</b>	Tejido cortical	0,41
	Integumentos	0,23
	Nucela	0,19
<b>Ovario sección inferior</b>	Tejido cortical	0,49
	Integumentos	0,23
	Nucela	0,42
<b>Estilo</b>	Tejido transmisor	0,22

Al día siguiente de la polinización, se cortaron los estilos y se midió su contenido en almidón. La densidad óptica de estos estilos osciló entre 244 y 496.127 píxeles, existiendo importantes diferencias en el contenido de almidón entre las flores en el momento de la segunda apertura del mismo modo que en el momento de antesis.

### **Estado nutritivo y destino de la flor**

El último paso consistía en relacionar el contenido de almidón de las flores con su destino final: abscisión o cuajado. Con este objetivo, se establecieron dos poblaciones de flores: aquellas que cayeron y aquellas que se transformaron en frutos y permanecían en el árbol en el momento de la cosecha. Las flores que se convirtieron en frutos presentaron un contenido de almidón en el estilo significativamente superior ( $p=0,01$ ) a aquellas que cayeron antes de alcanzar la madurez (Figura 9).



**Figura 9.** Contenido de almidón en el tejido cortical del estilo en dos poblaciones de flores: aquellas que caen y aquellas que son retenidas en el árbol hasta el momento de la cosecha. Las barras representan el error estándar.

## DISCUSIÓN

La información referente a los factores causantes de la baja tasa de cuajado observada en aguacate es dispersa y contradictoria. Desde el comienzo de la floración hasta varias semanas después del final de la floración tiene lugar una caída masiva de flores y frutos en desarrollo que ocasionan que menos del 1% de los frutos sean retenidos por el árbol (Sedgley, 1980; Lahav y Zamet, 1999). La producción excesiva de flores y la baja producción de frutos es un fenómeno frecuente en plantas (Stephenson, 1981; Sutherland y Delph, 1984; Sutherland, 1986) y esto se ha intentado explicar recurriendo a diferentes hipótesis (Holtsford, 1985; Kamoj et al., 2008). Estudios basados en la caída de frutos inmaduros en diferentes especies sugieren que las bajas tasas de cuajado no son necesariamente consecuencia de una polinización inadecuada, sino que podrían existir otros factores adicionales implicados (Lloyd, 1980; Stephenson, 1981, ver capítulo 3).

La competencia por los carbohidratos se ha propuesto como responsable de la caída de flores y frutos en diferentes especies (Scholefield et al., 1985; Buchholtz, 1986). En plantas leñosas de hoja perenne, el crecimiento del fruto está influenciado por las reservas de carbohidratos almacenados por el árbol



(Oliveira y Priestley, 1988). Así, trabajos realizados en cítricos ponen de manifiesto que incrementando la disponibilidad de carbohidratos se consigue aumentar el cuajado (Iglesias et al., 2003). El desarrollo inicial de las flores en albaricoquero, frutal de hoja caduca, también se ve afectado por las reservas nutritivas en el pistilo, donde se ha observado una gran variabilidad en las reservas de almidón entre flores en el momento de antesis (Rodrigo et al., 2000). En aguacate, la temprana caída de frutos se ha relacionado con las bajas reservas de carbohidratos en el árbol (Davie et al., 1995) y se ha visto que los azúcares de siete carbonos están implicados en el crecimiento del fruto y en su desarrollo (Bertling y Bower, 2006). Del mismo modo, la caída de frutos está acompañada de la reducción de carbono exportado desde las hojas (Finazzo y Davenport, 1986; Finazzo et al., 1994). Con el propósito de elucidar las causas de la caída masiva de flores en aguacate, en este trabajo se ha analizado la importancia de las reservas nutritivas de las flores en el cuajado.

### **El almidón en el estilo y en el ovario**

Los resultados obtenidos muestran que al mismo tiempo que se producen cambios a nivel morfológico en las flores, también se producen cambios en el contenido de almidón, de tal forma que éste se acumula en el ovario después de la antesis tanto en flores no polinizadas como en las polinizadas, por lo que la acumulación de los carbohidratos parece ser un proceso conservado independiente de la polinización. El patrón de acumulación del almidón es muy diferente al descrito en especies de hoja caduca histerantas, en las que se observa un descenso en el contenido de almidón en los días siguientes a la antesis al mismo tiempo que tiene lugar el desarrollo del ovario (Rodrigo et al., 2000), aunque sería de interés analizar el contenido de almidón más allá de los 9 días tras antesis analizados en este trabajo, de cara a evaluar la influencia de las reservas nutritivas en el desarrollo inicial del fruto.

Por otra parte, se estableció una correlación entre el contenido de almidón existente en el estilo y en el ovario, por lo que el contenido de almidón en el



estilo puede utilizarse para evaluar el contenido de almidón en el ovario. La presencia o ausencia de almidón en el ovario y en el óvulo tiene gran importancia en la fecundación y la fructificación (Rodrigo y Herrero, 1998; Rodrigo et al., 2000; Lebon et al., 2004).

### **Variabilidad entre flores en el contenido de almidón**

Los resultados obtenidos muestran que mientras que no existen diferencias externas evidentes entre las flores en el momento de anthesis, existe una amplia variabilidad en el contenido de almidón entre ellas. Estas diferencias no guardan relación con el tamaño del ovario. La amplia variabilidad en el contenido de almidón en anthesis observada en aguacate podría estar relacionada con la tasa de abscisión, puesto que se trata de una pequeña proporción de flores la que presenta un alto contenido de almidón en el ovario.

Los resultados también demuestran que existe una estrecha correlación entre la intensidad de la floración y el contenido de almidón en el año de alta producción. Así, en el momento de plena floración el contenido de almidón de las flores en anthesis fue bajo, mientras que al principio y al final de la etapa de floración las flores presentaron mayor contenido de almidón. En cítricos se ha establecido una estrecha correlación entre los niveles de carbohidratos y la intensidad de la floración (Goldschmidt et al., 1985). Sin embargo, este comportamiento no se observó en este trabajo en el año de baja producción, y probablemente sea debido a que las diferencias de la intensidad de floración durante las semanas de la etapa de floración fuesen menores que las observadas en el año de alta producción. El contenido de almidón no mostró grandes variaciones durante los dos años de estudio. Tampoco se observaron diferencias en la tasa de cuajado obtenida en ambos años (Capítulo 3). Por otra parte, no se han encontrado diferencias en el contenido de almidón entre flores dentro de la inflorescencia lo que puede tener relación con los resultados obtenidos en el capítulo 3 en los que no se observaba correlación entre la posición de la flor en la inflorescencia con la capacidad de cuajado.



## **El almidón está relacionado con el destino de la flor**

Por otra parte, cuando se analizaron las dos poblaciones de flores que mostraban diferente capacidad para transformarse en fruto (inflorescencias tempranas y tardías), se observó que el contenido de almidón era mayor en aquellas flores que normalmente se transforman en frutos, lo que sugiere que el estatus nutritivo de la flor en el momento de antesis juega un papel de gran relevancia en el destino reproductivo de la flor. El conocimiento del momento y de las causas que determinan estas diferencias observadas en ambas poblaciones y que, por tanto, determinará el éxito reproductivo sería de gran interés en la mejora de la producción bajo unas determinadas condiciones ambientales.

En este trabajo, sólo 20 flores de un total de 597 flores polinizadas se transformaron en frutos maduros siendo la tasa de cuajado de 3,35%. Al comparar esta tasa de cuajado con la obtenida en aquellas flores polinizadas que se usaron como control para estudiar el efecto de cortar el estilo, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), por lo que el método de cortar los estilos resulta de gran utilidad para establecer correlaciones entre las reservas nutritivas de la flor y el destino del ovario.

Durante mucho tiempo se ha reconocido el importante papel de los carbohidratos en el cuajado, de tal forma que tradicionalmente se han empleado prácticas agrícolas encaminadas a incrementar las reservas de carbohidratos, disminuyendo de este modo la abscisión de frutos y aumentando, por tanto, el cuajado. Así, se ha empleado durante mucho tiempo la técnica del anillamiento para incrementar la producción en frutales como el manzano (Griggs y Schrader, 1941), los cítricos (Rackham, 1966) y el aguacate (Lahav et al., 1970). En aguacate ésta práctica se ha empleado además para disminuir los efectos de la alternancia productiva, incrementando el tamaño del fruto y mejorando la producción (Davie et al., 1995).

Asegurar un aporte óptimo de carbohidratos en el momento en que los frutos en desarrollo están compitiendo con el crecimiento vegetativo sería de gran importancia para mejorar la producción. Por otra parte, con la finalidad de



incrementar la producción de aguacate, sería interesante eliminar o disminuir la alternancia productiva, que guarda una estrecha relación con los niveles de carbohidratos existentes en el árbol, incrementando los niveles de carbohidratos en los momentos de mayor requerimiento, como son la inducción floral y el desarrollo del fruto (Yu et al., 2000; Clément et al., 1996; De la Rosa et al., 2000; Rodrigo et al., 2000).

Dixon et al. (comunicación personal) establecieron en aguacate una correlación entre la caída de frutos y el contenido de almidón en la madera antes de la floración. Además, la producción en aguacate se ve incrementada cuando se aumenta la densidad de abejas en las plantaciones, dependiendo del grado de atracción de las abejas por el contenido de néctar que producen las flores (Johannsmeier et al., 1997), de tal forma que existen diferencias en el índice de néctar entre cultivares y entre flores del mismo cultivar. Los mismos autores han puesto de manifiesto que las abejas prefieren aquellas flores con mayor contenido de néctar. Este índice de néctar podría estar relacionado con el estatus nutritivo de la flor, por lo que sería interesante analizar una posible correlación entre ambos factores, probablemente implicados en el éxito reproductivo y por tanto, en la producción del aguacate.

A modo de conclusión, podríamos sugerir que son muchos los factores responsables de la producción en este frutal y que en este trabajo se ha puesto de manifiesto una estrecha correlación entre el estatus nutritivo de la flor y el cuajado, sugiriendo que, la capacidad de la flor para convertirse en fruto podría estar condicionada a priori por las reservas nutritivas, siendo una condición necesaria aunque no suficiente para el cuajado. No obstante, factores adicionales como una polinización eficiente y las condiciones ambientales podrían finalmente determinar el destino final de las flores y de los frutos en desarrollo.





**Parte III**  
**Implicaciones agronómicas**





## **5 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN UNA COLECCIÓN DE CULTIVARES DE AGUACATE Y GENOTIPOS LOCALES ESPAÑOLES USANDO SSRs.**

### **RESUMEN**

En este trabajo se han caracterizado 75 accesiones de aguacate mantenidas en una colección de germoplasma ex situ en la Estación Experimental La Mayora (España) empleando 16 microsatélites previamente desarrollados en esta especie.

En esta colección se incluyen tanto genotipos obtenidos mediante prospecciones locales en España como aquellos obtenidos por intercambio con diferentes países. Se detectaron un total de 156 fragmentos de amplificación oscilando desde 4 a 16 fragmentos por locus, con un valor medio de 9,75 alelos por locus. Los microsatélites empleados resultaron altamente informativos con un valor de heterozigosidad esperada mayor de 0,5 y de probabilidad de identidad (PI) inferior a 0,36. El total de probabilidad de identidad fue de  $2,85 \times 10^{-14}$ . Quince de los 16 microsatélites empleados mostraron un valor positivo para el índice de fijación de Wright, lo cual indica un déficit de heterocigotos, siendo el valor medio para todos los loci de 0,18. Se generó un dendrograma con el método de agrupamiento UPGMA basado en el índice de similitud de Nei y Li. Este dendrograma permitió la clasificación de todos los genotipos analizados en tres grupos principales que difieren fundamentalmente en su origen racial, aunque el valor de bootstrap es bajo debido a la existencia de híbridos interraciales en la colección. Todos los genotipos estudiados pueden ser inequívocamente identificados con la combinación de SSRs empleados a excepción de un grupo de mutantes de 'Hass' y otro grupo adicional formado por dos cultivares. Los resultados obtenidos indican que la combinación de SSRs empleada fue muy informativa y los resultados se discuten en base a su aplicación en la caracterización y el manejo del germoplasma de aguacate.

---

ALCARAZ M.L., J.I. HORMAZA (2007) Molecular characterization and genetic diversity in an avocado collection of cultivars and local Spanish genotypes using SSRs. *Hereditas* 144: 244-253. ANEXO I.



## INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un frutal subtropical de hoja perenne, nativo de América Central y Méjico, con 24 cromosomas ( $n=12$ ). Pertenece a la familia Lauraceae, familia mayoritariamente tropical o subtropical que se incluye en el orden Laurales dentro del complejo Magnolid de las angiospermas basales. Tradicionalmente se han descrito tres razas o variedades botánicas de aguacate adaptadas a diferentes condiciones climáticas: Mejicana [*P. americana* var. *drymifolia* (Schlecht. & Cham.) Blake], Guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis* L. Wms.) y Antillana (*P. americana* var. *americana* Mill). Estas razas se distinguen por sus caracteres morfológicos, fisiológicos y agronómicos. Así las razas Mejicana y Guatemalteca están adaptadas a climas más fríos mientras que la raza Antillana requiere para un desarrollo óptimo climas cálidos. La mayoría de los cultivares comerciales son híbridos interraciales. Así, los cultivares de mayor importancia en climas subtropicales, como ‘Hass’, ‘Bacon’ y ‘Fuerte’ son híbridos Guatemalteca x Mejicana con diferentes grados de hibridación.

La producción mundial de aguacate ha alcanzado más de 3 millones de toneladas, aunque más del 70% de esta producción se debe a unos pocos países (Méjico, Indonesia, Estados Unidos, Colombia, Brasil, Chile, La República Dominicana y Perú), siendo Méjico el mayor país productor con más de un millón de toneladas y el 30% de la producción mundial (Faostat, 2009). España es el único país europeo con una producción comercial significativa que alcanza aproximadamente 70.000 toneladas en 2005 (Faostat, 2009). Además, en España existen árboles antiguos en la Península y en las Islas Canarias procedentes de semillas traídas tras la colonización española de América mucho antes del establecimiento de una producción comercial.

Debido a las condiciones climáticas, la mayoría de los cultivares locales en las Islas Canarias son de raza Antillana, mientras que en la Península Ibérica son de raza Mejicana y Guatemalteca o híbridos entre ambas, aunque la identificación racial a partir del fruto o de la hoja resulta compleja. Como



consecuencia de la creciente importancia del cultivo de este frutal en España, se están estudiando diferentes portainjertos y cultivares para la optimización del cultivo del aguacate. Entre los portainjertos y cultivares se incluyen genotipos procedentes de distintos países así como selecciones locales obtenidas tras prospecciones de árboles élite que podrían estar bien adaptados a las condiciones ambientales locales.

La optimización y el manejo de los recursos genéticos requieren una precisa identificación de los genotipos así como una evaluación correcta tanto de la cantidad como de la distribución de la diversidad genética en las especies. En aguacate, como en otras especies de frutales, tradicionalmente se han empleado los caracteres morfológicos para identificar los distintos genotipos (IPGRI, 1995). Sin embargo, la evaluación de estos caracteres es una tarea costosa e inexacta debido a la influencia de factores ambientales, a la subjetividad de las evaluaciones y al limitado número de caracteres discriminantes. Por lo tanto, los marcadores genéticos se han empleado para identificar accesiones y elucidar las relaciones genéticas entre diferentes especies y genotipos en aguacate. Así, se han utilizado minisatélites (Lavi et al., 1991), VNTRs (Mhameed et al., 1997), RAPDs (Fiedler et al., 1998) o RFLPs (Furnier et al., 1990; Davis et al. 1998) para caracterizar molecularmente diferentes grupos de cultivares. Sin embargo, los microsatélites presentan una serie de ventajas para la caracterización molecular. Estas incluyen su herencia codominante y su alto grado de polimorfismo que los hacen adecuados para estudios de diversidad y relaciones intraespecíficas, su amplia dispersión por el genoma, su fácil detección mediante PCR, su alta reproducibilidad que permite un intercambio fiable de información y estandarización de protocolos entre laboratorios, su estabilidad somática y la posibilidad de transferencia interespecífica. Recientemente se han desarrollado microsatélites específicos de aguacate (Sharon et al., 1997; Ashworth et al., 2004; Borrone et al., 2007) que se han utilizado para caracterización molecular y estudios de diversidad genética (Schnell et al., 2003; Ashworth y Clegg, 2003).

Los objetivos de este trabajo consisten en la identificación de accesiones y la estimación de la diversidad genética dentro de la colección de germoplasma de



aguacate conservada en la E.E. La Mayora en Málaga (España) que incluye tanto cultivares locales como cultivares comerciales procedentes de distintos países usando marcadores microsatélites.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal**

En este trabajo, se han analizado 75 accesiones de aguacate procedentes de diversas zonas geográficas conservadas en la colección de aguacate de la E.E. La Mayora. En esta colección se incluyen 29 genotipos locales españoles así como 46 cultivares procedentes de diferentes países (Tabla 1). En los casos en que fue posible, se asignaron a los distintos cultivares su pertenencia a una de las tres razas botánicas (Mejicana, Guatemalteca y Antillana) a partir de la información obtenida de la base de datos de variedades de aguacate de la Universidad de California en Riverside (<http://www.ucavo.ucr.edu>) y de otras fuentes adicionales (Kadman and Ben-Ya'cov, 1980a, 1980b, 1981; Lahav et al., 1992; Lavi et al., 1997; Lopez et al., 2001; Ashworth y Clegg, 2003; Ben-Y'acov et al., 2003; Schnell et al., 2003).

### **Extracción de ADN y análisis de SSRs**

A partir de hojas jóvenes se aisló el ADN siguiendo el protocolo descrito por Hormaza (2002). Posteriormente, el ADN aislado se diluyó a una concentración 10  $\mu$ M con tampón TE modificado (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) y se almacenó a una temperatura de -20°C.

A partir de los SSRs publicados por Sharon et al. (1997) y Ashworth et al. (2004) se seleccionaron 16 SSRs en base a su grado de polimorfismo (Tabla 2). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 15  $\mu$ L que contenía 16 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 67 mM de Tris-HCl pH 8,8, 0,01% de Tween 20, 2 mM de



MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de cada dNTP, 0,4 μM de cada cebador, 25 ng de ADN genómico y 0,5 U de ADN polimerasa BioTaq™ (Bioline, London, Reino Unido). Los cebadores directos se marcaron con los fluorocromos D2, D3 y D4 WellRed en el extremo 5' (Proligo, France). Las reacciones se realizaron en un termociclador I-cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) siguiendo el siguiente perfil de temperaturas: un paso inicial de 1 minuto a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 1 minuto a 72°C, y un paso final de 5 minutos a 72°C. Los fragmentos de amplificación de la PCR se separaron mediante electroforesis capilar en un analizador automático de fragmentos CEQ™ 8000 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Cada reacción se repitió al menos dos veces para asegurar la reproducibilidad de los resultados.



**Tabla 1.** Lista de las 75 accesiones de aguacate evaluadas en este estudio con SSRs.

Accesión	País de origen	Raza	Accesión	País de origen	Raza
Acueductos	España (Málaga)	Desconocida	La Piscina	España (Málaga)	Desconocida
Adi	Israel	G X M <sup>10</sup>	Lohneiss	EE.UU.	Desconocida
Alhaurín	España (Málaga)	Desconocida	Lonjas	Méjico	M <sup>4</sup>
Anaheim	Honduras	G <sup>2,3</sup>	Lula	EE.UU.	G X M <sup>3</sup> /G x WI <sup>2,5</sup>
Bacon	EE.UU.	G X M <sup>1</sup> /M <sup>2,3</sup>	Maoz	Israel	WI <sup>8</sup>
Bentavol gar	España (Málaga)	Desconocida	Marvel (BL 516)	EE.UU.	G X M <sup>1</sup>
Bentavol inv	España (Málaga)	Desconocida	Mexicola	EE.UU.	M <sup>2,3</sup>
BL 5552	EE.UU.	G x M <sup>1</sup>	Monsalve	España (Málaga)	Desconocida
Bueno	España (Málaga)	Desconocida	Negra de la Cruz	Chile	M <sup>5</sup>
Clavero 2	España (Málaga)	Desconocida	Nobel (BL667)	EE.UU.	G X M <sup>1</sup>
Coín	España (Málaga)	Desconocida	OA184	EE.UU.	G X M <sup>1</sup>
Colin V-33	Méjico	MxG <sup>3</sup>	Pinkerton	EE.UU.	G X M <sup>1,2</sup>
Cupanda	Méjico	Desconocida	Regal	EE.UU.	Desconocida
Duke 6	Méjico	M <sup>1</sup>	Rincoatl	Méjico	M <sup>4</sup>
Duke 7	Méjico	M <sup>1</sup>	RR-86	España (Islas Canarias)	Desconocida
Duke Parent	Méjico	M <sup>1</sup>	San Javier 1	España (Málaga)	Desconocida
Eden	Israel	GxM <sup>6</sup>	San Javier 4	España (Málaga)	Desconocida
El Viso	España (Málaga)	Desconocida	San Javier 6	España (Málaga)	Desconocida
Eugenin	Chile	Desconocida	San Javier 8	España (Málaga)	Desconocida
Fito Chinaea	España (Islas Canarias)	Desconocida	San Javier 11	España (Málaga)	Desconocida
Fuerte	Méjico	G X M <sup>1</sup>	San Javier 12	España (Málaga)	Desconocida
Fundacion 2	Méjico	Desconocida	San Javier 13	España (Málaga)	Desconocida
Fuchs 20	Israel	WI x G <sup>7</sup>	San Javier 14	España (Málaga)	Desconocida
G-6	Guatemala	M <sup>1</sup>	San Javier 19	España (Málaga)	Desconocida
G 755 A	Guatemala	G X P. <i>schiedeana</i> <sup>1</sup>	San Javier 28	España (Málaga)	Desconocida
Gem (3-29-5)	EE.UU.	G x M <sup>1</sup> /G <sup>3</sup>	San Javier 29	España (Málaga)	Desconocida
Gvar 13	Israel	M <sup>9</sup>	S. Chinaea	España (Islas Canarias)	Desconocida
H670	EE.UU.	Desconocida	Schmidt	Méjico	G <sup>3</sup>
Harvest	EE.UU.	G X M <sup>1</sup> /G <sup>3</sup>	Scott	EE.UU.	M <sup>3</sup>
Hass	EE.UU.	G <sup>1,3</sup> /G x M <sup>2</sup>	Shepard	EE.UU.	G <sup>3</sup>
Hass Motril	España (Málaga)	Desconocida	Shiapacasse	Chile	Desconocida
Iriet	Israel	G X M <sup>2</sup>	Sir Prize	EE.UU.	M <sup>1</sup>
Jiménez 1	Méjico	Desconocida	Tacambaro	Méjico	Desconocida
Jiménez 2	Méjico	Desconocida	Thomas	EE.UU.	M <sup>1</sup>
La Cónsula 6	España (Málaga)	Desconocida	Topa Topa	EE.UU.	M <sup>1,2,3</sup>
La Cónsula 9	España (Málaga)	Desconocida	Toro Canyon	EE.UU.	M <sup>1,5</sup>
La Cónsula 12	España (Málaga)	Desconocida	Villena	España (Málaga)	Desconocida
Lamb Hass (BL122)	EE.UU.	G x M <sup>1,2</sup>			

Razas. G: Guatemalteca, M: Mejicana, WI: Antillana

<sup>1</sup> Ashworth y Clegg 2003

<sup>2</sup> Schnell et al. 2003

<sup>3</sup> <http://www.ucavo.ucr.edu>

<sup>4</sup> Lopez et al. 2001

<sup>5</sup> Ben-Ya'acov et al. 2003

<sup>6</sup> Lavi et al. 1997

<sup>7</sup> Kadman y Ben-Ya'acov 1981

<sup>8</sup> Kadman y Ben Ya'acov 1980a

<sup>9</sup> Kadman y Ben Ya'acov 1980b

<sup>10</sup> Lahav et al. 1992



## Análisis de datos

Para cada locus SSR se estableció la composición alélica de cada accesión y el número total de alelos. Los posibles alelos se denominaron con su tamaño indicado en pares de bases. La diversidad genética se estimó mediante los siguientes parámetros: número de alelos por locus ( $A$ ), heterozigosidad observada ( $H_o$ ) calculada como el número de genotipos heterocigotos sobre el número total de genotipos analizados para cada locus, heterocigosidad esperada ( $H_e = 1 - \sum p_i^2$  siendo  $p_i$  la frecuencia del  $i^{\text{th}}$  alelo, NEI 1973), número efectivo de alelos ( $N_e = 1/1-H_e$ ), índice de fijación de Wright (Wright, 1951) y la probabilidad de identidad ( $PI = 1 - \sum p_i^4 + \sum \sum (2p_i p_j)^2$ , siendo  $p_i$  y  $p_j$  la frecuencia de los alelos  $i^{\text{th}}$  y  $j^{\text{th}}$  respectivamente) que determina la probabilidad de que dos genotipos diploides escogidos al azar presenten el mismo perfil genético, es decir, que compartan los mismos alelos y que, por tanto, sean idénticos (Paetkau et al., 1995). La significación de las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) con una probabilidad  $p < 0,01$  para cada locus, se analizó siguiendo el método de la cadena de Harkov. Para el cálculo de estos parámetros se utilizaron varios programas informáticos. El programa ARLEQUIN versión 3.01 (Excoffier et al., 2005) se empleó para el cálculo de  $A$ ,  $H_o$ ,  $H_e$ , frecuencias alélicas (considerando  $p < 0,05$ ,  $p > 0,9$  como alelos raros y fijados respectivamente) y las desviaciones del HWE. El programa POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1997) se empleó para el cálculo de  $N_e$  y  $F$  y, finalmente, la Probabilidad de identidad se determinó con el programa IDENTITY 1.0 (<http://www.boku.ac.at/zag/forsch/identity.htm>).

Las relaciones genéticas entre los genotipos estudiados se analizaron con el método UPGMA, a partir de la matriz de similitud obtenida de la proporción de los fragmentos comunes (Nei and Li, 1979) con el programa NTSYSpc 2.11 (Exeter Software, Stauket; NY, USA). El coeficiente de correlación cofenético para el dendrograma se estimó después de la construcción de la matriz cofenética para medir la bondad del ajuste entre la matriz de similitud original y el dendrograma. La fiabilidad de los grupos del dendrograma se evaluó mediante



análisis de remuestreo bootstrap utilizando 2.000 réplicas con el programa Treecon 1.3b (Van De Peer y De Wachter, 1994).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En este trabajo se describe la caracterización de una colección de aguacates formada por 75 genotipos en los que se incluyen accesiones españolas junto con otros genotipos obtenidos a través de intercambio con otras colecciones de germoplasma de diferentes países. La raza de la mayoría de ellos ha sido previamente documentada en la literatura (Tabla 1).

### **Polimorfismo de SSRs y diversidad genética**

El nivel de polimorfismo de los 16 microsatélites se estimó en 75 accesiones y los parámetros de variabilidad se muestran en la tabla 2. Se observaron un total de 156 fragmentos de amplificación. El número de alelos por locus osciló desde 4 (AVT 386) a 16 (AVD 001) con una media de 9,75 alelos por locus. Este valor es similar al obtenido por Ashworth y Clegg (2003) empleando 25 loci SSR y 37 genotipos aunque significativamente inferior a los 18,8 alelos por locus obtenidos por Schnell et al. (2003) con 14 loci, probablemente debido al mayor número de accesiones (224) y las diferencias de origen en las accesiones estudiadas. El rango de los tamaños de los alelos obtenidos en nuestro trabajo fue similar al obtenido con los mismos SSRs por Schnell et al. (2003) y Ashworth y Clegg (2003) confirmando la efectividad de los SSRs para el análisis de la diversidad y el intercambio de datos entre laboratorios. Para todos los microsatélites se obtuvieron uno o dos fragmentos de amplificación por genotipo; por ello, se pueden considerar como un único locus SSR.

Las frecuencias alélicas oscilaron entre 0,006 y 0,55. No se observaron alelos fijados en la población ( $p > 0,9$ ) y se detectaron 83 alelos considerados como raros ( $p < 0,05$ ) que suponen un 53% del número total de alelos. Seis



accesiones locales ('Acueducto', 'Bentavol gar', 'Bentavol inv', 'Clavero 2', 'Monsalve' y 'San Javier 28') y 8 cultivares procedentes de distintos países ('Adi', 'Marvel', 'G 775A', 'Harvest', 'Lonjas', 'Lula', 'Mexicola' y 'Negra de la Cruz') mostraron un fragmento exclusivo. En la mayoría de los loci se obtuvo un alto nivel de polimorfismo. Así 9 de los 16 loci presentaron 10 o más alelos en las accesiones estudiadas. Por lo tanto, todos los microsatélites empleados resultaron ser altamente informativos con  $He \geq 0,5$  y  $PI \leq 0,35$  excepto el locus AVT386 que presentó el mínimo número de alelos (4) y el máximo PI (0,36).

La heterocigosidad observada osciló entre 0,22 en AVA12 y 0,85 en AVO102 con una media de 0,64. La heterocigosidad esperada varió entre 0,58 en AVA12 y 0,88 en AVAG21 con una media de 0,76. La comparación entre ambas heterocigosidades se realizó mediante el índice de Fijación de Wright (F). Para 15 de los 16 loci la heterocigosidad observada fue menor que la esperada y, por tanto, el valor del índice de fijación fue positivo con una media para todos los loci de 0,18, lo cual indica un déficit de heterocigotos; para el locus AVO102 el valor fue negativo. Estos resultados indican la existencia de un determinado grado de endogamia que podría ser explicado por el hecho de que gran parte de los genotipos estudiados están genéticamente emparentados.

Estas observaciones son coherentes con los resultados obtenidos en otros trabajos en aguacate empleando SSRs (Schnell et al., 2003; Borrone et al., 2007). Se observaron desviaciones significativas ( $p < 0,01$ ) del equilibrio de Hardy-Weinberg en 11 de los loci. Estos resultados eran esperables debido a que el material empleado en nuestro estudio no representa una muestra de genotipos elegidos al azar. Con respecto a la probabilidad de identidad, el valor máximo (0,36) se observó en el locus AVT 386 que presenta cuatro alelos, y el mínimo (0,06) en AVAG21 con 14 alelos. La media fue de 0,17 y la probabilidad de identidad total se estimó en  $2,85 \times 10^{-14}$ . El número efectivo de alelos osciló entre 2,31 (AVA 12) y 7,26 (AVAG 21) con un valor medio de 4,55.

Los valores de todos los parámetros, especialmente el valor de heterocigosidad esperada mayor de 0,5 y la probabilidad de identidad inferior a



0,36, indicaron que la combinación de microsatélites empleada es altamente informativa y, por tanto, una herramienta adecuada para estudios de caracterización y análisis de la diversidad en aguacate.

**Tabla 2.** Nombre del locus, referencia, número de alelos (A), rango de tamaño de los fragmentos amplificados, heterocigosidades observada (Ho) y esperada (He), índice de fijación de Wright (F), p-valor para las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), número efectivo de alelos (Ne) y probabilidad de identidad (PI) calculados para los 16 marcadores SSRs en 75 genotipos de aguacate.

<i>Locus</i>	<i>Referencia</i>	<i>A</i>	<i>Rango de tamaño (pb)</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>F</i>	<i>HWE</i>	<i>Ne</i>	<i>PI</i>
AVA 12	Sharon et al. (1997)	5	130-142	0,58	0,23	0,61	**	2,31	0,33
AVAG21	Sharon et al. (1997)	14	158-221	0,88	0,67	0,24	**	7,26	0,06
AVAG22	Sharon et al. (1997)	10	103-137	0,83	0,76	0,08	**	5,67	0,10
AVD 001	Ashworth et al. (2004)	16	208-267	0,86	0,63	0,27	**	6,83	0,07
AVD 003	Ashworth et al. (2004)	8	183-208	0,85	0,72	0,15	**	6,28	0,09
AVD 006	Ashworth et al. (2004)	14	301-348	0,84	0,61	0,27	**	5,59	0,08
AVD 013	Ashworth et al. (2004)	10	198-253	0,66	0,65	0,02	0,08	2,97	0,31
AVD 017	Ashworth et al. (2004)	9	170-223	0,78	0,64	0,18	**	4,44	0,13
AVD 018	Ashworth et al. (2004)	8	189-235	0,66	0,63	0,05	0,59	2,84	0,21
AVD 022	Ashworth et al. (2004)	10	220-258	0,77	0,72	0,07	**	4,31	0,17
AVO 102	Ashworth et al. (2004)	12	154-201	0,83	0,85	-0,03	**	5,44	0,11
AVT 226	Ashworth et al. (2004)	6	294-327	0,69	0,63	0,09	0,10	3,19	0,21
AVT 372	Ashworth et al. (2004)	5	172-185	0,72	0,68	0,05	0,12	3,42	0,24
AVT 386	Ashworth et al. (2004)	4	220-234	0,63	0,56	0,11	0,40	2,69	0,36
AV MIX03	Sharon et al. (1997)	14	145-190	0,80	0,69	0,13	**	4,84	0,10
AV MIX04	Sharon et al. (1997)	11	160-194	0,81	0,56	0,30	**	4,76	0,11
Media		9,75		0,76	0,64	0,18		4,55	0,17

\*\* Significativo a  $P \leq 0,01$

### Identificación de las diferentes accesiones

La combinación de los diferentes fragmentos de amplificación obtenidos con los 16 SSRs permitió distinguir 66 perfiles genéticos, de los cuales 64 se corresponden con genotipos únicos y los 11 restantes aparecen formando dos grupos de 9 y 2 accesiones indistinguibles. El grupo formado por nueve accesiones idénticas incluye a ‘Hass’ (el cultivar más importante a nivel mundial y bien adaptado a climas Mediterráneos) y 8 accesiones similares a ‘Hass’; las distintas accesiones muestran una gran semejanza a nivel morfológico con el



cultivar Hass, lo cual podría indicar su procedencia a partir de mutaciones de 'Hass'. El segundo grupo se compone de las accesiones 'Colin V33' y 'Shepard', que se esperaría que fuesen diferentes; por ello, esta sinonimia podría ser debida a un error en nuestra colección. El hecho de que todas las accesiones similares a 'Hass' estudiadas mostraron el mismo perfil genético que 'Hass' indican la fiabilidad de la metodología empleada para obtener y analizar los datos de SSRs.

Los valores de similitud entre las diferentes accesiones de aguacate oscilaron entre 0,04 ('Topa Topa' y 'Shepard', 'Colin V33' y 'Rincoatl') y 0,96 ('Duke 6' y 'Duke Parent') con un valor medio de 0,19 para todas las accesiones.

Desafortunadamente, no existen datos publicados en la literatura referentes al tamaño de los alelos SSRs para la mayoría de los cultivares de aguacate. Solamente fue posible la comparación de dos cultivares incluidos en trabajos anteriores empleando varios microsatélites usados en nuestro trabajo: 'Hass' en Ashworth et al. (2004) y 'Pinkerton' en Sharon et al. (1997) y Schnell et al. (2003). Con respecto a 'Hass', el tamaño de los fragmentos fue similar para 7 de los 10 loci incluidos en ambos estudios. Las diferencias detectadas en los tamaños de los fragmentos con respecto al trabajo de Ashworth et al. (2004) probablemente sean debidas al uso de metodologías diferentes (secuenciación de los clones que contienen microsatélites frente al análisis de fragmentos) que permitiría explicar las diferencias en la longitud de los fragmentos. De hecho, Ashworth (comunicación personal) obtuvo tamaños de fragmentos similares a los obtenidos en este trabajo empleando un sistema de análisis automático de ADN, corroborando el consenso de que empleando una metodología común el tamaño de los fragmentos es idéntico o similar.

En el caso de 'Pinkerton' se pudieron comparar nuestros resultados para 4 loci con los de Sharon et al. (1997) y Schnell et al. (2003) (AVAMIX03, AVAG21, AVAG22 y AVAMIX04). Nuestros resultados mostraron mayor similitud con los obtenidos por Schnell et al. (2003), siendo el tamaño de nuestros fragmentos superior en 4 pb. La mayoría de las diferencias señaladas entre estos dos trabajos y los de Sharon et al. (1997) podrían deberse al empleo



## Capítulo 5

de análisis automático de fragmentos en contraposición a la electroforesis en poliacrilamida empleada por Sharon et al. (1997). No obstante, problemas similares podrían surgir al comparar el resto de los cultivares que no se han analizado en otros trabajos; por ello, sería necesario disponer de un mayor número de trabajos en los que se analicen genotipos de diversa procedencia. Para solventar estos problemas, incluimos una tabla (Tabla 3) en la que se muestra el tamaño de los fragmentos amplificados para los distintos cultivares analizados en este trabajo, con el fin de permitir la comparación con los resultados obtenidos por distintos grupos de investigación para establecer una nomenclatura común, lo que permitiría optimizar el manejo e intercambio de germoplasma de aguacate.

**Tabla 3.** Fragmentos de amplificación obtenidos con 16 loci SSR en 75 genotipos de aguacate.

	AVA12	AVAG21	AVAG22	AVD001	AVD003	AVD006	AVD013	AVD017	AVD018	AVD022	AVD102	AVT226	AVT372	AVT386	AVMIX03	AVAMIX04
Acueductos	133/133	175/203	110/125	242/242	186/203	341/341	220/220	170/188	214/224	250/258	154/172	296/309	185/185	220/230	147/147	162/181
Adi	135/135	185/203	115/125	225/242	190/203	303/324	217/236	172/214	214/224	223/223	194/199	300/309	172/185	230/230	147/151	181/181
Alharurín	130/130	183/183	103/110	225/235	194/194	322/330	220/220	170/170	189/224	223/250	158/194	300/303	181/181	220/220	176/176	162/184
Anaheim	133/133	183/183	106/106	225/235	190/203	330/341	217/220	170/172	224/230	230/230	160/162	294/300	175/185	224/230	147/159	164/181
Bacon	133/135	158/183	106/130	242/242	186/199	303/330	217/220	170/198	203/214	225/250	158/160	296/303	172/175	220/230	147/174	168/172
Bentavol gar	130/130	183/207	103/103	225/238	194/194	301/301	220/220	170/188	189/189	223/230	154/160	296/303	185/185	220/224	147/185	184/184
Bentavol inv	135/135	203/203	103/127	254/265	190/194	322/322	220/220	170/170	224/224	220/233	158/167	300/300	181/185	220/220	147/147	162/168
BL5552	135/135	171/201	121/125	242/242	183/188	318/341	217/220	170/214	214/224	225/225	154/160	294/303	172/185	230/230	147/174	181/181
Bueno	130/135	183/183	103/110	230/252	194/194	318/318	217/220	170/186	189/224	223/250	158/160	300/300	175/185	220/224	147/169	162/184
Clavero 2	140/140	181/181	110/110	230/230	190/190	316/348	220/220	178/223	230/230	230/247	194/194	300/300	175/175	230/230	145/154	174/174
Coín	133/133	183/183	106/110	240/240	188/188	341/341	217/217	188/188	224/224	258/258	154/158	296/296	175/175	220/220	180/190	162/162
Colin V-33 <sup>1</sup>	135/135	171/171	121/125	242/242	183/186	303/330	220/253	170/198	214/230	230/250	160/194	300/309	172/181	220/230	169/174	181/186
Cupanda	130/135	183/192	106/127	240/254	194/194	318/322	217/220	170/170	203/224	223/230	158/158	300/327	175/185	220/220	147/180	181/181
Duke 6	130/130	192/192	127/130	254/267	190/194	318/318	217/217	170/170	224/224	256/256	158/160	300/300	181/185	224/224	147/147	160/184
Duke 7	130/135	203/203	106/130	244/267	194/199	318/318	217/220	170/170	224/224	250/256	158/160	294/300	181/185	224/230	147/147	160/181
Duke Parent	130/130	192/203	127/130	254/267	190/194	318/318	217/217	170/170	224/224	250/256	158/160	300/300	181/185	224/224	147/147	160/184
Eden	135/135	185/203	121/130	242/242	186/186	330/330	217/220	170/170	221/230	223/250	160/199	300/309	172/185	230/230	147/162	172/181
El Viso	135/135	197/203	106/110	225/242	201/203	303/341	220/242	170/170	214/224	250/250	170/201	309/309	175/185	224/230	147/174	162/184
Fito China	130/130	171/203	106/130	249/267	194/194	322/341	217/217	170/170	221/224	250/258	158/170	300/300	185/185	220/220	147/185	168/168
Fuerte	135/135	183/203	106/125	225/242	186/203	303/318	220/242	170/214	214/224	223/250	154/170	300/309	172/185	220/230	147/174	162/181
Fuchs 20	133/140	181/181	106/125	230/240	190/203	330/341	220/250	170/172	224/230	225/258	192/194	300/309	175/181	230/230	154/159	176/176
Fundacion 2	135/135	185/201	106/121	227/242	186/203	318/324	217/242	172/214	224/230	230/250	154/158	303/309	172/175	224/230	147/162	162/181
G-6	135/135	203/171	106/106	246/249	183/183	306/306	217/217	170/170	189/189	225/233	154/160	300/300	175/181	220/224	147/147	162/174
G 755 A	135/135	187/187	125/125	208/267	186/194	303/336	198/250	172/194	221/221	223/223	158/162	300/303	172/181	220/224	151/176	174/174
Gem (3-29-5)	135/135	171/201	121/125	225/225	183/183	324/341	217/220	170/214	214/224	230/230	154/160	300/303	172/185	224/230	147/174	181/181
Gvar 13	133/133	183/221	106/106	227/235	190/201	330/341	217/220	170/172	224/230	230/247	160/162	294/300	175/185	224/230	147/159	164/181
Harvest	135/135	181/201	117/125	242/246	183/190	341/341	217/250	172/214	224/235	223/230	160/194	294/303	172/181	224/230	159/174	181/181
Hass <sup>2</sup>	135/135	185/201	121/125	225/225	183/203	318/324	217/242	172/214	224/224	223/230	154/199	300/303	172/185	230/230	147/162	181/181
Hass Motril	135/135	185/201	121/125	225/225	183/203	318/324	217/242	172/214	224/224	223/230	154/199	300/303	172/185	230/230	147/162	181/181
Iriet	135/135	171/201	121/125	227/242	186/203	324/341	220/242	214/214	214/224	223/230	154/160	303/309	181/185	230/230	147/174	172/181

La Cónsula 6	130/130	171/207	110/110	225/249	194/201	318/318	217/220	170/188	224/224	223/250	154/158	296/303	185/185	220/224	169/176	162/174
La Cónsula 9	130/130	171/207	106/110	225/249	194/201	318/318	217/220	170/186	189/224	223/223	154/158	296/303	185/185	224/230	169/169	162/174
La Cónsula 12	130/135	171/183	106/110	230/249	201/201	318/318	217/217	178/188	224/224	223/250	154/154	300/300	185/185	220/230	169/169	174/194
Lamb Hass (BL122)	135/135	183/201	121/121	227/242	183/188	318/341	217/220	170/214	214/224	223/230	154/160	303/303	172/172	224/230	174/174	181/186
La Piscina	130/130	183/183	103/110	225/252	194/201	318/318	217/220	170/170	189/224	223/250	154/160	300/300	175/185	220/224	147/176	162/184
Lonjas	133/133	183/201	110/125	227/249	188/203	313/318	224/242	172/223	206/224	223/241	154/167	300/303	175/185	220/230	145/145	176/181
Lula	130/135	183/203	110/130	242/242	183/194	332/341	220/234	172/172	221/230	223/223	154/158	300/303	175/175	224/234	147/162	162/176
Maoz	142/142	221/221	121/121	230/242	201/201	341/341	220/220	178/178	230/230	230/230	194/201	300/300	175/175	230/230	154/154	176/176
Marvel (BL 516)	133/133	183/183	110/121	242/242	190/190	318/341	220/220	170/172	214/214	223/230	158/158	296/303	172/175	220/224	171/185	162/181
Mexicola	135/135	195/195	103/106	233/242	194/194	330/341	217/220	170/188	189/224	223/247	158/162	303/327	178/181	220/230	169/169	162/184
Monsalve	135/135	203/203	103/125	225/254	183/203	303/318	231/242	170/170	214/230	230/250	154/160	300/327	185/185	220/220	147/174	168/181
Negra de la Cruz	135/135	171/192	106/125	242/242	183/203	318/341	217/220	170/172	214/224	223/223	158/194	296/309	181/185	220/230	162/183	162/194
Nobel (BL667)	135/135	171/201	121/125	227/242	183/183	341/341	220/220	170/214	214/224	230/230	154/199	303/303	172/172	224/230	174/174	181/186
OA184	135/135	158/185	121/125	227/242	186/203	324/324	217/217	198/214	224/230	230/230	154/199	303/303	172/172	230/230	147/162	181/181
Pinkerton	135/135	185/203	121/121	225/244	183/186	324/330	217/220	170/214	221/224	223/250	194/199	300/309	172/185	230/230	147/169	181/181
Regal	135/135	201/192	125/125	225/225	183/183	318/344	220/242	214/214	214/224	223/230	160/199	300/303	185/185	220/220	147/174	181/181
Rincoatl	135/135	171/203	121/125	242/242	183/186	303/330	220/253	170/172	214/221	230/250	170/194	309/309	172/185	220/230	147/169	181/186
RR-86	135/135	181/181	106/121	225/242	194/203	303/316	220/220	170/223	224/230	223/250	154/194	300/300	172/175	220/230	145/174	162/176
San Javier 1	130/135	171/183	106/110	249/249	194/201	344/344	220/220	178/186	221/224	250/250	154/158	300/300	175/185	220/230	145/169	174/174
San Javier 4	130/135	171/203	110/130	230/244	194/201	306/318	220/220	170/178	224/224	223/250	154/158	294/300	175/185	220/230	147/169	174/194
San Javier 6	130/135	171/183	106/110	230/249	194/201	318/344	217/220	178/186	221/224	223/250	154/158	300/300	175/185	220/230	145/169	174/194
San Javier 8	130/135	183/183	110/110	230/249	194/201	318/344	217/220	188/188	224/224	223/250	154/158	300/300	175/175	230/230	169/169	174/194
San Javier 11	130/135	171/181	106/110	230/249	194/201	306/344	217/220	186/186	221/224	223/250	154/158	300/300	185/185	220/230	169/169	174/174
San Javier 12	135/135	171/171	106/110	230/249	194/201	306/306	217/217	178/186	221/224	223/250	158/158	300/300	185/185	220/220	147/169	174/174
San Javier 13	130/135	171/171	106/110	230/249	201/201	318/318	217/220	178/188	221/224	250/250	158/158	300/300	185/185	220/230	169/169	174/194
San Javier 14	133/133	183/183	106/130	242/242	188/201	324/324	217/217	170/178	224/224	223/258	154/158	296/296	175/175	220/220	147/180	162/162
San Javier 19	130/135	171/181	106/110	230/249	194/201	306/306	217/220	178/188	221/224	250/250	154/158	300/300	175/185	220/234	147/169	174/194
San Javier 28	135/140	171/181	110/110	249/254	201/201	344/344	220/220	178/178	224/230	223/250	158/190	300/300	175/185	220/230	151/169	174/194
San Javier 29	130/130	181/181	106/106	230/249	194/201	344/344	220/220	178/188	221/224	223/258	154/154	300/300	175/175	220/230	147/169	174/174
S. China	135/135	192/201	103/106	235/235	188/203	301/318	220/220	170/170	224/224	223/223	154/192	294/300	181/185	220/220	151/151	162/181
Schmidt	130/135	183/183	110/110	249/254	190/190	318/318	217/217	170/170	214/230	250/256	158/158	296/303	185/185	220/224	147/147	174/174
Scott	133/133	175/183	106/137	235/246	194/199	318/318	220/220	170/170	189/221	250/250	158/162	300/327	175/185	220/224	147/147	162/162
Shepard	135/135	171/171	121/125	242/242	183/186	303/330	220/253	170/198	214/230	230/250	160/194	300/309	172/181	220/230	169/174	181/186

Sir Prize	135/135	185/201	121/121	225/225	183/183	318/341	217/242	214/214	224/224	230/230	160/199	300/303	172/172	230/230	162/174	181/181
Thomas	133/133	183/197	106/137	225/246	199/199	318/318	217/220	170/170	189/224	223/250	158/158	300/327	181/185	220/220	147/147	168/184
Topa Topa	133/133	175/183	106/110	240/242	188/208	301/301	217/217	188/188	224/224	258/258	154/158	294/296	175/175	220/220	180/190	162/162
Toro Canyon	135/135	171/192	127/127	240/244	183/188	330/341	217/220	170/170	221/224	250/258	170/170	296/309	172/185	220/230	147/147	162/181
Villena	135/135	171/183	106/125	225/235	186/203	318/341	220/242	170/214	214/224	230/250	167/167	300/300	172/185	220/230	147/147	162/181

<sup>1</sup> Shepard presenta el mismo perfil genético que Colin V-33.

<sup>2</sup> Las siguientes accesiones presentan el mismo perfil genético que Hass: Eugenin, Hass Motril, H670, Jiménez1, Jiménez2, Lonheis, Shiapacasse y Tacámbaro



## Relaciones de similitud entre accesiones

El dendrograma generado por análisis de agrupamiento UPGMA basado en el índice de similitud de Nei y Li mostró un coeficiente de correlación cofenética de 0,83, que indica una buena bondad de ajuste entre la matriz cofenética y la de similitud. El dendrograma se muestra en la Figura 1. La accesión más divergente es G755A, previamente identificada mediante análisis de isoenzimas como un híbrido interespecífico entre *P. americana* y *P. schiedeana* (Ellstrand et al., 1986) y aparece en un grupo separado del resto de los genotipos. Por otra parte, separado del resto de los genotipos analizados, encontramos un pequeño grupo en el que se incluye un cultivar Antillano ('Maoz'), uno Mejicano ('Gvar13'), uno Guatemalteco ('Anaheim') y un híbrido GxWI ('Fusch 20').

El resto de los genotipos analizados se dividen en dos grupos principales con bajo valor de bootstrap en los que se engloban accesiones de diferente origen racial. En el grupo superior del dendrograma se incluyen la mayoría de los cultivares de raza Mejicana, tales como 'Topa-Topa', 'G6', 'Duke 6', 'Duke 7', 'Duke Parent', 'Méxicola', 'Scott', 'Thomas' o 'Bacon' (en ocasiones descrito como híbrido GxM) así como un genotipo Guatemalteco ('Schmidt'), algunos híbridos GxM como 'Marvel' o 'Lula' (en ocasiones descrito como GxWI) y 'Cupanda' (de raza desconocida); el resto se corresponde con 20 genotipos españoles cuyo pedigree se desconoce y fueron prospectados en la provincia de Málaga junto con un genotipo procedente de las Islas Canarias. La raza Mejicana está adaptada a climas semitropicales mostrando una mayor tolerancia al frío (Bergh y Ellstrand 1986) y, en base a estos resultados, podríamos plantear la hipótesis de que la mayoría de las accesiones prospectadas en la España continental son de raza Mejicana o híbridos GxM donde prevalecería la raza Mejicana. Fijándonos en los genotipos locales, observamos un grupo con un valor de bootstrap significativo en el que se incluye los genotipos de 'San Javier' y 'La Cónsula' procedentes de la misma zona de prospección así como 'Coín'



con ‘Topa Topa’ lo que sugiere que ‘Coín’ podría haberse obtenido a partir de semillas de ‘Topa Topa’.

En el segundo grupo se engloban cultivares de diverso origen. Así, la mayoría de los genotipos son híbridos GxM [‘Harvest’, a veces considerado como Guatemalteco, ‘Hass’, en ocasiones considerado como Guatemalteco, ‘OA184’, ‘Adi’, ‘Nobel’, ‘Lamb Hass’, ‘Gem’ a veces considerado como Guatemalteco, ‘BL 5552’, ‘Iriet’, ‘Fuerte’, ‘Colin V33’, ‘Pinkerton’ y su descendiente ‘Eden’ (Lavi et al., 1997)] junto con algunos de raza Mejicana (como ‘Sir Prize’ tradicionalmente considerado como un descendiente de ‘Hass’, ‘Negra de la Cruz’, ‘Rincoatl’, ‘Toro Canyon’ y ‘Lonjas’). En este grupo se incluyen 6 accesiones locales (4 procedentes de Málaga y 2 de las Islas Canarias).





Con la combinación de microsatélites empleados no se pudo establecer un agrupamiento claro basado en el origen racial de los diferentes cultivares. Esto podría deberse al hecho de que la mayoría de los cultivares mantenidos en nuestra colección son híbridos y al escaso número de accesiones Guatemaltecas y Antillanas puras. Estos resultados coinciden con trabajos anteriores empleando marcadores moleculares (Ashworth y Clegg, 2003) donde la presencia de genotipos híbridos disminuye la distancia genética entre los grupos de los respectivos parentales. Trabajos anteriores en los que se han empleado caracteres morfológicos (Kopp, 1966) y diferentes marcadores moleculares han agrupado en un mismo grupo las accesiones Guatemaltecas y Antillanas (Buffler y Ben-Ya'acov, 1992; Fiedler et al., 1998; Mhameed et al., 1997). Sin embargo, otros trabajos basados en el empleo de isoenzimas (Goldring et al., 1985), caracteres morfológicos (Bergh y Lahav, 1996) y marcadores moleculares (Furnier et al., 1990) podían distinguir claramente entre las 3 razas tradicionales. Para elucidar esta controversia se requiere de trabajos adicionales basados en el empleo de un mayor número de marcadores moleculares y el análisis de genotipos a los que se les pueda asignar correctamente su origen racial.



# 6 EFECTO DE LA DISTANCIA ENTRE CULTIVARES COMPLEMENTARIOS EN LA TASA DE FECUNDACIÓN CRUZADA Y EN LA PRODUCCIÓN EN EL CULTIVAR HASS

## INTRODUCCIÓN

El aguacate se caracteriza por presentar un comportamiento floral poco común: la dicogamia protogínica. La flor de aguacate, a pesar de ser hermafrodita, presenta órganos masculinos y femeninos que no son funcionales en el mismo momento; así, cada flor de aguacate abre dos veces, la primera vez como flor funcionalmente femenina (estigma receptivo) y, tras cerrarse, vuelve a abrirse al día siguiente en estado masculino (anteras dehiscentes). Los distintos cultivares de aguacate se clasifican en base a su comportamiento floral en dos grupos: A y B. Los cultivares de tipo A son aquellos cuyas flores abren en estado femenino por la mañana, cierran a mediodía y vuelven a abrirse la tarde del día siguiente en estado masculino, mientras que las flores de los cultivares de tipo B abren en estado femenino por la tarde, cierran al anochecer y abren la mañana del día siguiente en estado masculino. Así ambos son complementarios y la transferencia de polen de un cultivar de tipo A a uno de tipo B tendrá lugar por la tarde mientras que, los cultivares de tipo B transfieren polen a los de tipo A por la mañana. Por ello, este comportamiento floral se ha considerado como un mecanismo encaminado a evitar la autofecundación; no obstante, esta dicogamia es altamente sensible a las condiciones ambientales (Stout, 1923, Bringhurst, 1951; Bergh, 1969, 1974, Gazit, 1977; Sedgley, 1977b; Sedgley y Annells, 1981; Sedgley y Grant, 1983).

El principal problema del cultivo de este frutal es que, a pesar de tener una capacidad potencial de producción de  $32,5 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$  (Wolstenholme, 1986), su producción media real es muy baja; así en España es de aproximadamente  $6,5 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ . A pesar de presentar una floración exuberante, sólo unas pocas flores llegan a transformarse en frutos debido a una caída masiva de flores y frutos,



considerándose una producción de 300 frutos por árbol como una buena cosecha (Lahav y Zamet, 1999). Esta enorme caída de frutos acontece mayoritariamente en los meses posteriores a la floración (Lahav y Zamet, 1999, capítulo 3) y se ha descrito como una caída selectiva en base a su composición genética (Degani et al., 1986, 1997a). Además la caída de flores y de frutos también se ve intensificada por diversos factores meteorológicos como son el viento, la temperatura y la humedad relativa (Sedgley, 1977b; Oppenheimer, 1978; Sedgley y Annells, 1981; Gafni, 1984).

Tras la observación de su peculiar biología floral (Nirody, 1922; Stout, 1923; Stout y Savage, 1925) se recomendó a los agricultores la plantación de forma intercalada de cultivares de tipo A y tipo B con la finalidad de incrementar la producción. Esta práctica agrícola se fundamenta en la observación de que la producción aumentaba significativamente plantando cultivares complementarios en proximidad (Bergh y Gustafson, 1951; Bergh y Garber, 1964; Bergh, 1966). Sin embargo, durante mucho tiempo se ha discutido el efecto de la distancia entre cultivares complementarios en la tasa de fecundación cruzada y en la producción. El establecimiento del efecto de la alogamia en la producción se ha llevado a cabo empleando distintos polinizadores, de tal forma que usando los cultivares Ettinger (Degani et al., 1989) y Bacon (Vrecenas-Gadus y Ellstrand, 1985) como polinizadores se establece esta correlación y se observa que la producción es inferior en parcelas monovarietales (Vrecenas-Gadus y Ellstrand, 1985) debido a una abscisión selectiva de frutos autofecundados (Vrecenas-Gadus y Ellstrand, 1985). Varios trabajos han corroborado la existencia de un efecto de la distancia entre cultivares complementarios sobre el cuajado (Stout y Savage, 1925; Bergh y Garber, 1964; Gustafson y Bergh, 1966; Bergh, 1968; Degani et al., 1989, 1997a; Arpaia et al., 2005). Sin embargo, en otros trabajos (Goldring et al., 1987; Johannsmeier y Morudu, 1999; Garner et al., 2008) se observaron que no había correlación alguna con respecto a la distancia existente entre cultivares complementarios y la tasa de fecundación cruzada, si bien es cierto que la mayoría de los frutos procedían de fecundación cruzada. Además, en California al comparar este efecto en zonas de interior y costeras se encontró



una débil y nula correlación respectivamente (Arpaia et al., 2005) lo que indica la importante influencia de las condiciones ambientales.

En general se obtiene producciones satisfactorias en parcelas monovarietales: así, en California, aunque la mayor parte de los frutos procedía de autofecundación, las cosechas son buenas (Bergh, 1958; Davenport, 2004; Kobayashi et al., 2000) y en Florida la mayor transferencia de polen tiene lugar durante la apertura de la flor en estado masculino, siendo la autofecundación la forma más frecuente de polinización bajo esas condiciones (Davenport y Lahav, 1992; Davenport et al., 1994). Por lo tanto, todo parece indicar que los resultados obtenidos en una determinada zona no son necesariamente transferibles a otras regiones con distintas condiciones climáticas y en los que se emplean distintos cultivares y portainjertos.

Un amplio número de trabajos explican la alta tasa de alogamia estimada en parcelas mixtas en base al aborto de frutos autofecundados, lo cual sugiere la existencia de un mecanismo de caída selectiva. Este aborto selectivo observado en distintos cultivares ha llevado a concluir que la fecundación cruzada aportaría ventajas a la descendencia confiriéndoles mayor supervivencia frente a los frutos autofecundados (Degani et al., 1997a, Robbertse et al., 1997; Degani et al., 2003) aunque en esta caída selectiva el genotipo del donador de polen jugará un importante papel aumentando la supervivencia de su descendencia y diferirá considerablemente uno de otro (Degani et al., 1984; Degani y Gazit, 1984; Degani et al., 1989, 1994).

Para determinar los sistemas de reproducción en plantas frecuentemente se estudia la tasa de alogamia que presenta variaciones espaciales dentro y entre poblaciones y a lo largo del tiempo dentro de una misma población (Wolfe y Shore, 1992; Nason y Hamrick, 1997). La tasa de alogamia se ha estimado tradicionalmente mediante ensayos de cruzamientos; sin embargo, el uso de marcadores fenotípicos en árboles presenta una serie de limitaciones debido al largo periodo de tiempo requerido por la progenie para alcanzar la madurez. Por ello el desarrollo de marcadores isoenzimáticos supuso un gran avance puesto



que permitió disponer de numerosos marcadores genéticos que serían de gran utilidad para la estimación de los sistemas de reproducción en poblaciones de plantas (Brown y Allard, 1970).

En aguacate se han empleado distintos métodos para la determinación de la tasa de alogamia siendo el primero de ellos el análisis mediante isoenzimas (Degani et al., 1997, Vrecenar-Gadus y Ellstrand, 1985; Goldring, 1987, Degani y Gazit, 1987). Posteriormente, se emplearon marcadores RAPDs (Kobayashi et al., 2000). Por último, el desarrollo de de marcadores tipo microsatélite (Ashworth et al., 2004; Borrone et al., 2007; Sharon et al., 1997) aumentó el número de marcadores informativos disponibles. Así, los microsatélites han resultado de gran utilidad para este tipo de estudios debido a su alto grado de polimorfismo y a su segregación codominante (Davenport, 2006; Borrone et al., 2008; Garner et al., 2008).

Dadas las diferencias encontradas entre zonas productoras y la controversia existente sobre el efecto de la alogamia en la producción de aguacate, nos planteamos los siguientes objetivos: (1) estimar la tasa de fecundación cruzada en una parcela monovarietal situada en proximidad a otra de un cultivar complementario, (2) Determinar la posible relación entre fecundación cruzada y distancia al polinizador, (3) estimar la relación entre alogamia y producción, (4) estudiar la variación de la tasa de fecundación cruzada con el transcurso del tiempo, (5) determinar si la caída de frutos que acontece los meses posteriores a la etapa de floración ocurre o no de forma selectiva, (6) comparar la alogamia en dos cultivares complementarios. Para el cálculo de la alogamia previamente se disponía de la información generada en el capítulo anterior que permitía distinguir los posibles parentales presentes en la E.E. la Mayora.



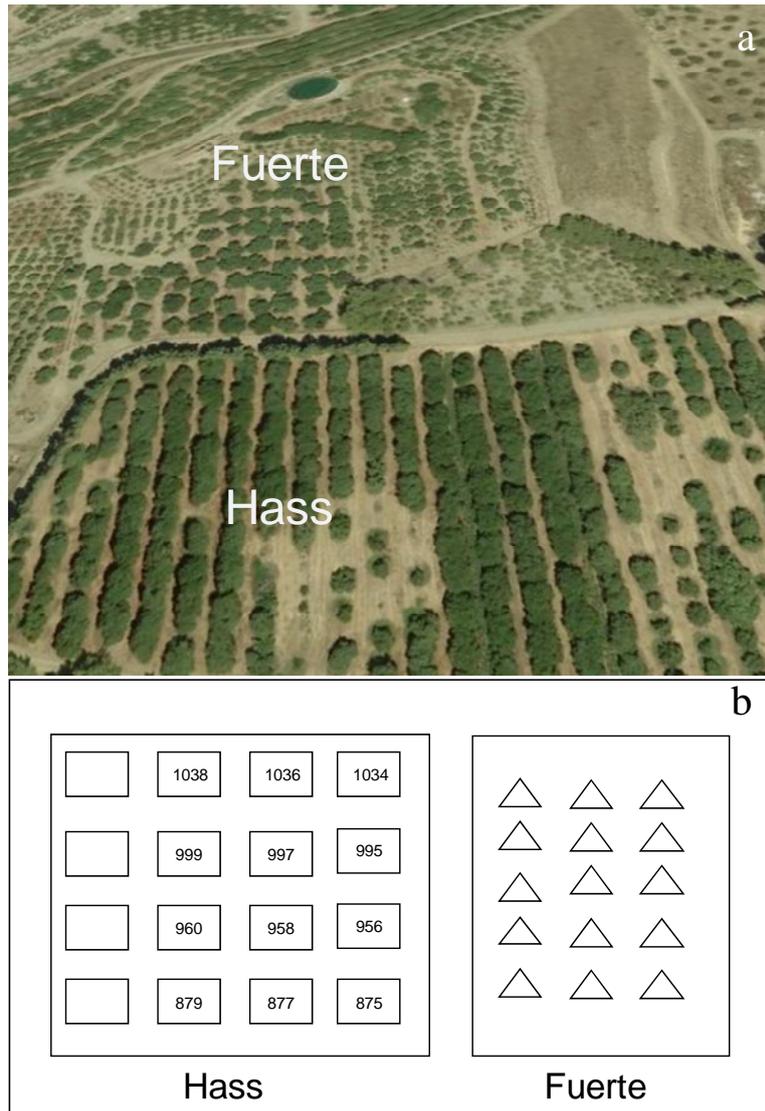
## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Este trabajo se llevó a cabo en la Estación Experimental La Mayora (Málaga, España) durante dos años consecutivos (2005 y 2006) en una parcela monovarietal del cultivar Hass enfrentada a otra parcela del cultivar Fuerte, siendo ambos cultivares complementarios en cuanto a su comportamiento floral. Las flores del cultivar Hass abren en estado femenino durante la mañana, cierran a mediodía y vuelven a abrirse la tarde del día siguiente en estado masculino, mientras que las flores del cultivar Fuerte abren en estado femenino por la tarde y en estado masculino por la mañana. ‘Fuerte’, es el cultivar más frecuentemente empleado como donador de polen en España.

### Efecto de la distancia en la tasa de fecundación cruzada y en la producción

Para determinar si bajo nuestras condiciones climáticas la distancia entre cultivares complementarios afecta a la tasa de fecundación cruzada y a la producción, dentro de una parcela monovarietal de ‘Hass’ se seleccionaron 12 árboles divididos en tres hileras compuestas cada una de ellas por cuatro árboles. Cada hilera se situaba a diferentes distancias de la parcela en la que se encontraba el polinizador. El plano de la parcela y una vista aérea se muestra en la Figura 1. La distancia entre la primera hilera y la parcela de ‘Fuerte’ es de 20 metros y la distancia entre las distintas hileras es de 8 metros.



**Figura 1.** Vista aérea de las dos parcelas de ‘Hass’ y ‘Fuerte’ enfrentadas (a). Plano de la parcela de estudio (b).

Tras la etapa de floración del cultivar Hass, se colocaron unas redes bajo los 12 árboles seleccionados en la parcela anteriormente descrita, con el fin de recoger los frutos que fuesen cayendo. A finales del mes de mayo, momento en el cual podían distinguirse claramente distintas poblaciones de frutos en base a su tamaño, se marcaron una serie de frutos en cada uno de los doce árboles y se especificó el tamaño de cada uno de ellos (pequeño, mediano y grande). Durante los meses de junio y julio diariamente se recogieron los frutos caídos en la red. Tras estos dos meses, la recolección de frutos se hizo semanalmente. Se



recolectó un total de 800 frutos caídos, de los que solamente 718 presentaban un embrión apto para el análisis de paternidad.

En la época de cosecha, durante dos años consecutivos, cuando los frutos alcanzaron su estado de madurez se recogieron aproximadamente 30 frutos al azar de cada árbol para posteriormente determinar su parental masculino. En este ensayo se analizaron un total de 720 frutos. Además, de cada árbol se cosecharon todos los frutos, se contaron y pesaron para estimar la producción de cada uno de los árboles.

### **Variación de la tasa de fecundación cruzada en el tiempo**

Con la finalidad de estudiar la posible variación de la tasa de fecundación cruzada a lo largo del tiempo, desde el final de la etapa de floración hasta la recolección de los frutos, se seleccionó una parcela mixta con árboles de ‘Hass’ y ‘Fuerte’ situados de forma alternativa uno a continuación de otro donde seleccionamos cuatro árboles, dos de cada variedad. Durante los tres primeros meses tras la floración, semanalmente se cogieron 10 frutos de cada árbol y durante los meses posteriores la recogida de frutos se hizo cada quince días. Para este estudio se emplearon un total de 387 frutos de ‘Hass’ y 320 frutos de ‘Fuerte’.

### **Relación entre características de los frutos y el polinizador**

Por otra parte, en la etapa de cosecha de 2008, se recogieron un total de 944 frutos de distintos árboles de ‘Hass’ situados en una parcela enfrentada a otra de ‘Fuerte’ (Figura 1). Estos frutos fueron pesados y se midió su diámetro y su longitud; se les extrajo la semilla para pesarla y medirla. Posteriormente se obtuvo ADN a partir del embrión para el análisis de paternidad.



## **Extracción de ADN y análisis de SSRs**

Para determinar los posibles parentales masculinos de la progenie analizada se utilizaron los resultados obtenidos en la caracterización varietal (Capítulo 5) al igual que para la selección de cebadores que permitían diferenciar los frutos procedentes de cruzamiento de aquellos autofecundados. La extracción de ADN se realizó a partir de los embriones de los frutos colectados usando el protocolo descrito por Hormaza (2002). La utilización de un único cebador (AVAG21) previamente publicado por Sharon et al. (1997) fue suficiente para discernir entre eventos de autofecundación y de fecundación cruzada. Este cebador produce los tamaños de amplificación de 186 y 201 para 'Hass' y 183 y 203 para 'Fuerte'.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 15 µl que contiene 15 ng de ADN genómico, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, tampón 10x, 0,1 mM de cada cebador, 0,625mM de cada uno de los dNTP y 0,5 unidades de ADN Taq polimerasa, BioTaq™ (Bioline, London, UK). El cebador directo se marcó con los fluorocromos D2, D3 y D4 de Beckman Coulter (Proligo, France). Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador I-cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) con el siguiente perfil de temperaturas: un paso inicial de 1 minuto a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a temperatura de anillamiento (50°C) y un paso de extensión de 5 minutos a 72°C.

Los fragmentos amplificados se separaron mediante electroforesis capilar en un analizador automático de fragmentos CEQ™ 8000 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

## **Análisis de paternidad**

La identificación del donador de polen se llevó a cabo de forma manual y fue corroborado mediante el uso del programa CERVUS 2.0 (Marshall et al., 1998). Este programa resultó de gran utilidad puesto que calcula la máxima



probabilidad en la asignación de paternidad. Se calcularon los siguientes parámetros: análisis de paternidad, probabilidad de exclusión y probabilidad de identidad. El parámetro LOD determina la probabilidad de que un genotipo sea el parental masculino en comparación con el resto de genotipos analizados. Así, el genotipo que mostró mayor valor de LOD fue considerado como el parental masculino.

La tasa de fecundación cruzada y su error estándar se calculó de acuerdo a Shaw et al. (1981).

### **Análisis estadístico**

Para analizar la homogeneidad de las varianzas aplicamos el test de Levéne. Tras asumir la homogeneidad de varianzas, se aplicó un ANOVA que permitió discernir si existía diferencias entre los distintos tratamientos analizados aunque para determinar entre qué grupos existen diferencias aplicamos los tests Post-hoc de Duncan (DMR) y Tukey (HSD).

## **RESULTADOS**

### **Efecto de la distancia a la fuente donadora de polen en la tasa de alogamia**

El locus microsatélite seleccionado permitió distinguir claramente entre todos los frutos procedentes de autofecundación y de fecundación cruzada, reduciéndose de esta forma los posibles errores. El valor de LOD para el parental masculino más probable osciló desde 0,23 a 1,39 con un valor medio de 0,4.

La tasa de fecundación cruzada mostró una amplia variación entre árboles de la misma parcela. En la tabla 1 se muestran los valores de fecundación cruzada de los diferentes árboles en los dos años de estudio. No se encontraron grandes diferencias en cuanto a este parámetro entre años; así, en el año 2005, la



tasa de fecundación cruzada osciló entre 0,32 y 0,68 y en 2006 entre 0,31 y 0,74, siendo los valores medios de 0,44 y 0,50 respectivamente.

Las comparaciones entre la tasa de fecundación cruzada de las distintas hileras puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre las distintas hileras durante los dos años de estudio ( $p=0,045$  en 2005 y  $p=0,049$  en 2006). El valor más alto de fecundación cruzada se encontró en la hilera más próxima al polinizador y fue disminuyendo conforme aumentó la distancia. La tasa de fecundación cruzada en la primera hilera fue significativamente superior que la de las otras dos más distantes a la fuente donadora de polen ( $p=0,01$ ); sin embargo entre estas dos no se encontraron diferencias significativas ( $p=0,568$ ).

**Tabla 1.** Tasa de alogamia y producción en una parcela de ‘Hass’ enfrentada a otra de un cultivar complementario ‘Fuerte’. La hilera 1 es la situada más próxima al cultivar complementario y la 3 la más alejada. Cosecha 2005 (año de baja producción) y 2006 (año alta producción). P indica el valor de producción (Kg/árbol).

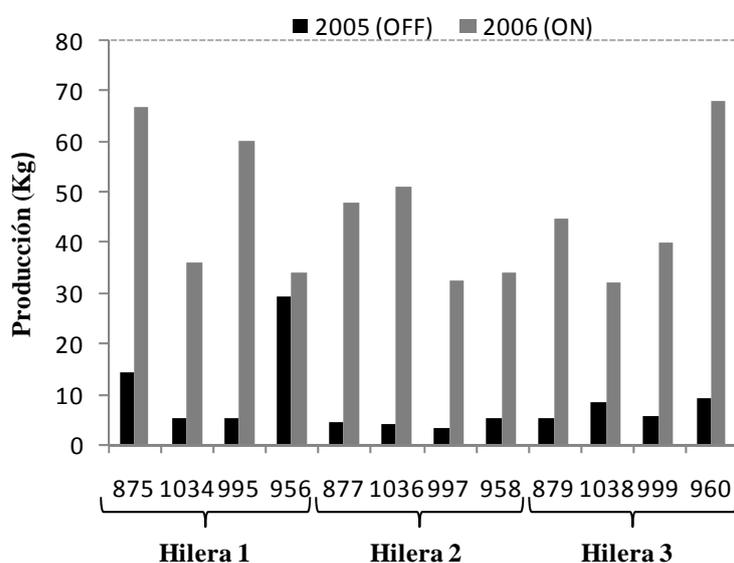
ÁRBOL	HILERA	FRUTOS 2005	ALOGAMIA 2005	P 2005	FRUTOS 2006	ALOGAMIA 2006	P 2006
875	1	18	0,50 ± 0,12	14,66	29	0,62 ± 0,09	67
1034	1	19	0,68 ± 0,11	5,5	17	0,47 ± 0,12	36,19
995	1	18	0,50 ± 0,12	5,6	24	0,67 ± 0,10	60,2
956	1	19	0,47 ± 0,11	29,66	19	0,74 ± 0,10	34,29
<b>Media</b>	1	18,5	0,54 ± 0,05	13,86	22,25	0,63 ± 0,06	49,42
877	2	19	0,37 ± 0,11	4,9	21	0,33 ± 0,09	48
1036	2	15	0,53 ± 0,13	4,3	17	0,53 ± 0,12	51,17
997	2	17	0,41 ± 0,12	3,74	40	0,65 ± 0,08	32,59
958	2	19	0,37 ± 0,11	5,5	15	0,47 ± 0,13	34,47
<b>Media</b>	2	17,5	0,42 ± 0,04	4,61	23,25	0,50 ± 0,07	41,56
879	3	20	0,35 ± 0,11	5,5	36	0,31 ± 0,08	45
1038	3	19	0,32 ± 0,11	8,49	14	0,43 ± 0,13	32,38
999	3	19	0,47 ± 0,11	5,93	22	0,50 ± 0,11	40,19
960	3	20	0,35 ± 0,11	9,3	55	0,31 ± 0,06	68,36
<b>Media</b>	3	19,5	0,37 ± 0,03	7,3	31,75	0,39 ± 0,05	46,48

### Efecto de la distancia al polinizador en la producción

En este trabajo no se ha observado ninguna relación entre la tasa de fecundación cruzada y la producción durante los tres años de estudio: 2005 y 2006 con un nivel de significación de 0,864 y 0,702 respectivamente.



Únicamente durante el año 2005, que se correspondía con un año de baja cosecha, se estableció una importante correlación ente la distancia a la fuente donadora de polen y la producción, con un valor de Pearson de  $-0,686$  ( $p=0,014$ ); sin embargo, durante los otros dos años no se volvió a observar esta relación. Así en 2006 se obtuvo un valor de Pearson de  $-0,119$  ( $p=0,712$ ) y en 2008 el estadístico de Pearson fue de  $-0,048$  ( $p=0,798$ ). Esto indica que conforme aumenta la distancia a la fuente donadora de polen no se observan variaciones en la producción (Figura 2).



**Figura 2.** Producción medida en Kg en los árboles analizados durante dos años, uno de baja producción (2005) y el siguiente de alta producción (2006).

### Aborto selectivo de frutos

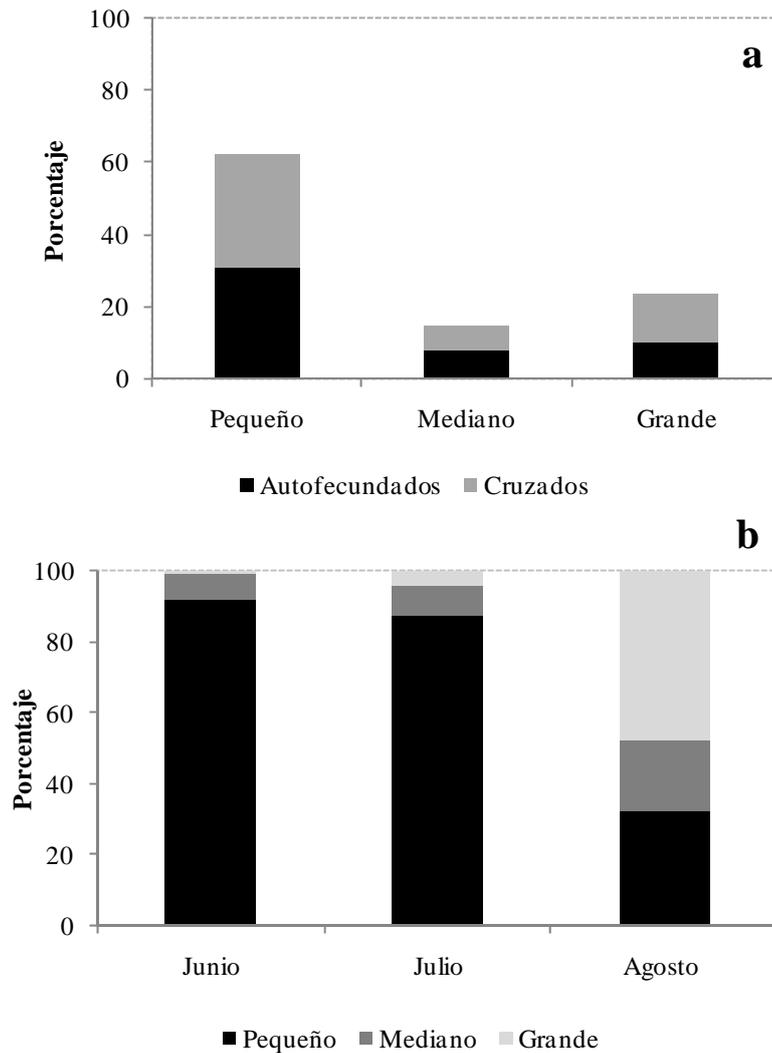
Para este ensayo se analizaron los frutos que habían sido marcados y habían caído durante los meses posteriores a la floración dentro de la red colocada debajo de cada árbol. Se calculó el porcentaje de estos frutos que derivaban de cruzamientos y el porcentaje de autofecundación.

Estudiando con detenimiento el porcentaje de frutos caídos, encontramos que en junio el 59% de los frutos caídos eran resultado de autofecundación, mientras que en julio y agosto solamente el 42% y 40% respectivamente procedían de autofecundación. De esta forma, la caída que tiene lugar durante el mes de junio mostró diferencias con respecto a la observada en los meses



posteriores ( $p=0,001$ ), cayendo en junio preferentemente los frutos autofecundados.

Sin embargo, a la hora de estudiar la caída selectiva en aguacate es necesario considerar el tamaño de los frutos. Con este propósito al finalizar la etapa de floración se marcaron frutos de tres tamaños en cada uno de los árboles objeto de estudio. Así, la caída en función del tamaño mostró diferencias significativas, de tal forma que en los meses de junio y julio los frutos que se recolectaron en las redes eran fundamentalmente los que habían sido marcado como de pequeño tamaño (95% y 85% respectivamente) mientras que los frutos que cayeron en agosto y en septiembre habían sido marcados como frutos grandes (48%) al finalizar la floración (Figura 3b). Por lo tanto, la caída de frutos de pequeño tamaño inicial tiene lugar durante los dos meses posteriores a la floración, mientras que es a partir de agosto cuando empieza la caída de frutos de mayor tamaño inicial. Esta caída disminuyó considerablemente en el mes de Septiembre.



**Figura 3.** (a) Porcentaje de los frutos marcados caídos durante los meses posteriores a la etapa de floración en función de tamaño y de su origen. (b) Porcentaje de frutos caídos durante los meses posteriores a la floración en base a su tamaño. Estos frutos se marcaron a mitad del mes de mayo en base a su tamaño.

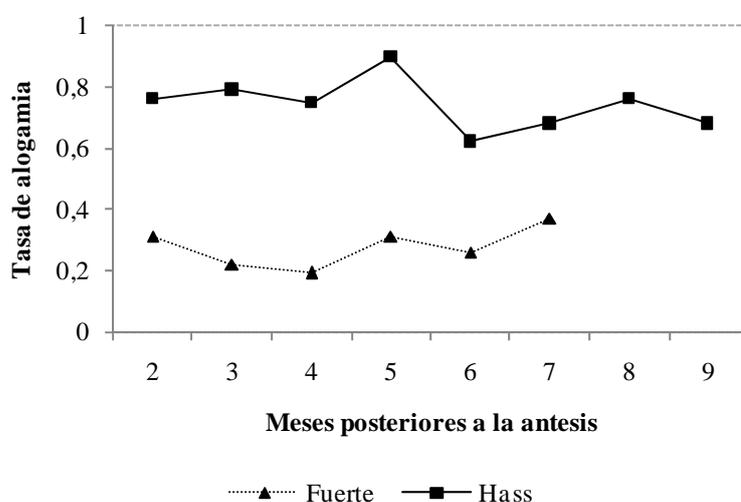
### Variación de la tasa de fecundación cruzada a lo largo del tiempo

La variación de la tasa de fecundación cruzada desde el final de la etapa de floración hasta que los frutos alcanzaron el estado de madurez se estudió en una parcela mixta compuesta por dos cultivares complementarios ('Hass' y 'Fuerte'). La tasa de fecundación cruzada varió significativamente entre los dos cultivares a lo largo del tiempo ( $P < 0,001$ ). Así en el cultivar Hass osciló desde 0,58 a 0,90 mientras que en el cultivar Fuerte desde 0,14 a 0,45 (Figura 4). Del mismo modo, la tasa de fecundación cruzada en este tipo de parcela es muy superior a la



observada en parcelas monovarietales enfrentada a un polinizador. Si comparamos los resultados obtenidos en la parcela mixta con los que obtuvimos en la hilera con mayor proximidad al polinizador, las tasas de fecundación cruzada no muestran diferencias ( $p=0,11$ ), con lo que nuevamente se pone de manifiesto la importancia de la distancia en la tasa de fecundación cruzada.

Las variaciones en la tasa de fecundación cruzada a lo largo del tiempo desde el mes de junio, momento en el que se inició el estudio ( $p>0,05$ ) no han sido significativas dentro de cada cultivar (Figura 4).



**Figura 4.** Variación de la tasa de alogamia en una parcela mixta a lo largo del tiempo en los cultivares Hass y Fuerte.

### Características de los frutos en base al parental masculino

El donador de polen ejerce una importante influencia en las características de los frutos; así, se han observado diferencias en cuanto al peso dependiendo de si el fruto procedía de autofecundación o fecundación cruzada con 'Fuerte'. Estas diferencias se deben a que el peso de los frutos obtenidos tras fecundación cruzada era mayor que el de autofecundados y estos últimos presentaban unas semillas de mayor peso. No obstante, no se han obtenido diferencias en cuanto al diámetro ( $p=0,471$ ) ni longitud ( $p=0,09$ ) entre las semillas de ambos. Con respecto al fruto se han observado diferencias en cuanto al diámetro ( $p<0,01$ ) en función del donador de polen pero no en la longitud del mismo ( $p=0,848$ ).



## DISCUSIÓN

Este trabajo es el primer estudio de tasa de fecundación cruzada en parcelas comerciales de aguacate en el sureste español. En trabajos anteriores en otras regiones, la estimación de este parámetro se ha realizado empleando marcadores isoenzimáticos (Gazit, 1984; Goldring et al., 1985; Vrecenas-Gadus y Ellstrand, 1985, Degani et al., 1989, 1990, 1994, 1997a), RAPDs (Kobayashi et al., 2000) y, en los últimos años, mediante SSRs (Davenport et al., 2006; Borrone et al., 2008). Los resultados que presentamos en este trabajo ponen de manifiesto que los microsatélites resultan muy efectivos para llevar a cabo este tipo de estudio por heredarse de forma codominante.

El principal objetivo de este trabajo es determinar la tasa de fecundación cruzada usando un locus con segregación mendeliana en una región de clima mediterráneo donde se han descrito problemas de baja producción. La selección del locus para llevar a cabo este estudio se fundamentó en el hecho de que permitía discernir inequívocamente frutos formados a partir de autofecundación o de cruzamientos.

### **Efecto de la distancia entre cultivares en la fecundación cruzada**

En los últimos años se ha discutido el efecto que ejerce la distancia entre cultivares complementarios en la composición genética de la descendencia en aguacate. En la mayoría de los trabajos se pone de manifiesto que conforme aumenta la distancia entre cultivares complementarios disminuye el porcentaje de frutos procedentes de cruzamientos (Degani et al., 1989, 1990, 1997; Vrecenas Gadus y Ellstrans, 1985, Guil y Gazit, 1992; Degani et al., 1997a, Kobayashi et al., 2000); sin embargo, Goldring et al. (1987) no encontraron tal relación, si bien es cierto que la mayoría de los frutos eran resultado de fecundación cruzada.

En este trabajo observamos un claro efecto de la distancia entre cultivares en la tasa de fecundación cruzada, encontrando el mayor porcentaje de frutos de fecundación cruzada en proximidad a la parcela donde se encuentra el



polinizador y este porcentaje fue disminuyendo a medida aumentaba la distancia. Por consiguiente, la situación del polinizador juega un papel claro determinando la composición genética de la descendencia. Esta observación se ha visto afianzada en la parcela mixta en la que ambos cultivares se hallan intercalados. La tasa de fecundación cruzada obtenida en nuestras parcelas fue muy inferior a la obtenida por Degani et al. (1997) empleando isoenzimas y con distancias similares a las empleadas en este trabajo, pero modificando el cultivar empleado como donador de polen, que en su caso fue 'Ettinger', cultivar que ha sido descrito como buen parental masculino y femenino (Degani et al., 1990). Estas diferencias sugieren que no sólo la distancia ejerce un importante papel en la tasa de fecundación cruzada sino también el cultivar empleado como donador de polen (Degani et al., 1989). Además, la fecundación cruzada muestra grandes variaciones dentro de la misma parcela y de un árbol a otro (Degani et al., 1989; Kobayashi et al., 2000; Vrecenas-Gadus y Ellstrand, 1985).

Por otra parte, la tasa de fecundación cruzada también muestra variaciones dependiendo del cultivar femenino de estudio aunque las condiciones de cultivo sean idénticas. Así, en este trabajo se observa que la tasa de alogamia en el caso de 'Hass' fue muy superior a la observada en 'Fuerte'. Kobayashi et al. (2000) estimaron este parámetro en el cultivar Fuerte obteniendo valores muy superiores a los obtenidos en este trabajo. Los altos niveles de autofecundación detectados en el caso de 'Fuerte' bajo nuestras condiciones de cultivo no son totalmente inesperados teniendo en cuenta el solape en las etapas de floración que presentan ambos cultivares. En el sur de España la floración de 'Hass' empieza dos semanas más tarde que la de 'Fuerte' y solamente se solapan durante tres semanas. Por ello, al no disponer de polen de 'Hass' los primeros frutos desarrollados en 'Fuerte' son resultado de autofecundación; una vez que comienza la floración de 'Hass', los nuevos frutos resultados de fecundación cruzada deben competir con los ya existentes autofecundados. En el caso de 'Hass' ocurre al revés. Los primeros frutos son resultado de fecundación cruzada mientras que los procedentes de autofecundación se desarrollan preferentemente en la segunda mitad del periodo de floración. Por otra parte, se han descrito



anomalías en el ciclo floral del cultivar Fuerte (capítulo 7) de tal forma que, las flores de ‘Fuerte’ abren en estado femenino a última hora de la tarde, permaneciendo alguna de ellas abiertas durante gran parte de la noche e incluso parte de la mañana del día siguiente encontrándose frecuentemente flores en estado masculino y femenino en el mismo árbol o entre árboles. Este comportamiento se puede explicar por la mayor sensibilidad que muestran los cultivares de tipo B en comparación con los de tipo A a las bajas temperaturas (Sedgley y Grant, 1983).

### **Relación entre fecundación cruzada y producción**

La importancia de la tasa de fecundación cruzada en la producción ha sido objeto de gran controversia en los últimos años. Esta correlación se ha estudiado en distintas áreas productoras de aguacate; sin embargo, los resultados obtenidos han sido muy contradictorios y, por ello, el conocimiento de cómo la producción se ve afectada por el sistema de reproducción en cada región resulta de gran importancia para maximizar la producción. Además, la necesidad de este estudio se ve intensificada por el hecho de que las variedades empleadas como polinizadores generalmente adquieren en el mercado un valor económico muy inferior al de ‘Hass’, de ahí que sea necesario disponer de tal información a la hora de diseñar las plantaciones. Por ello, es necesario considerar los beneficios que realmente aporta el plantar intercaladamente estos cultivares y si estos beneficios compensan las pérdidas económicas ocasionadas al destinar un 16% de la plantación a un cultivar con menor interés comercial (Garner et al., 2008).

Es necesario considerar que estos resultados se van a ver afectados por las condiciones climáticas de cada zona de estudio. En Israel se ha establecido la existencia de correlación entre fecundación cruzada y producción (Degani et al., 1989, 1990, 1997a) aunque Degani et al. (1997a) sugirieron que una alta tasa de fecundación cruzada no siempre va acompañada de una alta producción. En California, los resultados han oscilado desde la existencia de correlación (Vrecenas-Gadus y Ellstrand, 1985), baja correlación (Kobayashi et al., 2000) a



no existencia de relación (Garner et al., 2008). En Sudáfrica, no se ha encontrado efecto de la distancia entre cultivares complementarios en la producción (Robbertse et al., 1996; Johannsmeier y Morudu, 1999). Recientemente se han llevado a cabo una serie de estudios en Florida que sugieren que la mayoría de los frutos son resultados de cruzamientos, aunque no se ha estimado su efecto en la producción (Borrone et al., 2008). Garner et al. (2008) sugieren que en las zonas costeras debido a las condiciones ambientales, el comportamiento floral se puede ver alterado favoreciéndose la autofecundación con el consiguiente descenso de fecundación cruzada. Un mecanismo similar podría explicar la existencia de altas tasas de autofecundación en Florida (Davenport et al., 1994).

En este trabajo no se ha encontrado correlación entre la tasa de fecundación cruzada y la producción, así que en nuestras condiciones de cultivo los cruzamientos parece no ser la causa determinante de la baja producción obtenida. En general, en estos trabajos hay que considerar el cultivar empleado como polinizador puesto que es un factor determinante en la producción ya que se han descrito diferencias en la eficiencia de los polinizadores confiriendo ventajas en las supervivencia de su progenie.

### **Caída selectiva de frutos**

En aguacate, frecuentemente la baja producción se ha asociado a una caída masiva de frutos procedentes de autofecundación (Degani et al., 1984; 1986) sugiriendo que el genotipo del embrión juega un importante papel en la retención de los frutos por el árbol. Del mismo modo, se ha sugerido que existen diferencias en cuanto a la eficiencia de los polinizadores transfiriendo ventajas a la descendencia para su supervivencia. En Israel se ha observado el aborto selectivo de embriones procedentes de autofecundación (Degani et al., 1986, 1997) y en el sur de Florida, pese a que el 95% de los frutos son resultado de autofecundación, la mayor parte de los frutos que alcanzan su estado de madurez son resultado de fecundación cruzada (Borrone et al., 2008).



Además, hay una serie de trabajos en los que se pone de manifiesto que la entrada del tubo polínico dentro del ovario es dependiente del genotipo del polinizador (Robbetse et al., 1995; Sedgley, 1977; Sedgley y Grant, 1983) mostrándose de esta forma variaciones en la descendencia en función de la combinación de parentales (Degani y Gazit, 1984).

La hipótesis de la caída selectiva enfatiza la importancia del polinizador, por lo que debe ser un factor tenido en cuenta a la hora de realizar este tipo de estudio. En este trabajo no se han obtenido evidencias de que se produzca un aborto selectivo de frutos. Si bien es cierto que un alto porcentaje de los frutos que caen el mes siguiente al final de la floración proceden de autofecundación, la caída que se observa durante el mes de julio también presenta un alto porcentaje de frutos procedentes de cruzamientos. Para analizar con detalle este punto decidimos separar los frutos en función de su tamaño. Si no hubiésemos tenido en cuenta el tamaño de los frutos que caen, los datos indicarían que durante el mes de junio sí que existe una caída preferente de frutos autofecundados. Sin embargo, la mayor parte de los frutos que caen durante los meses de junio y julio son frutos que al final de la floración fueron seleccionados por presentar un tamaño pequeño, lo que hace suponer que se correspondían con las flores que fueron polinizadas durante las últimas semanas de la etapa de floración de 'Hass'. El comienzo de la floración de 'Hass' se solapa con la floración de 'Fuerte' aproximadamente durante 3 semanas, siendo la primera de ellas cuando 'Fuerte' se encuentra en plena floración. Los frutos que al final de la floración se marcaron como grandes y medianos pueden haberse formado durante estas primeras semanas. Durante aproximadamente las dos últimas semanas de la floración de 'Hass', el cultivar 'Fuerte' presenta muy pocas o ninguna flor, por lo que no es un polinizador efectivo durante esta etapa y la mayor parte de los frutos que se forman proceden de autofecundación. Estos frutos de pequeño tamaño formados preferentemente al final de la etapa de floración independientemente de su genotipo van a presentar una serie de desventajas frente a los frutos de mayor tamaño a la hora de competir por las reservas nutritivas, competencia que se ve intensificada por el crecimiento vegetativo que tiene lugar durante la primavera.



Por tanto, los resultados indican que la caída selectiva de frutos tendría más relación con la fecha de fecundación que con la composición genética de la descendencia. Quedaría por comprobar si una situación similar puede explicar la caída selectiva observada en otras regiones.

Esta caída de frutos se ve favorecida por el importante incremento de temperatura que tiene lugar durante los meses de verano (la temperatura media en el mes de junio es de 25°C y en el mes de julio es de 28-30°C) y las altas temperatura aceleran esta caída (Bergh, 1976; Sedgley y Annells, 1981).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que los frutos maduros procedentes de cruzamiento entre ‘Hass’ y ‘Fuerte’ presentan un peso y diámetro superior que los procedentes de autofecundación, aunque estas variaciones podrían ser también debidas al momento de su formación. En el caso de la semilla los frutos procedentes de cruzamientos poseen un peso inferior, mientras que no se han observado variaciones ni en el diámetro ni en la longitud de la semilla entre ambos. Este efecto del polen sobre las características del fruto puede ser un caso de metaxenia. En el caso del aguacate se han descrito resultados similares en Israel utilizando ‘Fuerte’ como parental femenino y el peso del fruto y la semilla variaban en función de los parentales utilizados, de forma que los tamaños más pequeños de fruto y semilla se obtenían con la autofecundación de ‘Fuerte’ comparado con cruzamientos con ‘Topa Topa’ o ‘Ettinger’ (Degani et al., 1990). Sería necesario llevar a cabo un estudio exhaustivo para determinar si estas ventajas comerciales (mayor tamaño de frutos y semillas de menor tamaño) son suficientes para contrarrestar las pérdidas económicas que supone el intercalar en las parcelas ‘Fuerte’ como polinizador. En cualquier caso, el uso de un polinizador sería indispensable en aquellas regiones donde la dicogamia protogínica sea estricta.

En resumen, se podría decir que el aguacate presenta en nuestra zona de cultivo un sistema mixto de reproducción, en el que la autofecundación es importante para asegurar una buena producción. Esta autofecundación se ve favorecida por el solape entre estadios sexuales ocasionado en gran parte por las



condiciones climáticas existentes. Por ello y debido a que no existe una correlación clara entre fecundación cruzada y producción, aquellas condiciones que favorezcan la autopolinización también contribuirán a una mayor producción.

Hay que tener en cuenta que estas conclusiones no son necesariamente extrapolables a otras regiones ni al uso de otros cultivares como donadores de polen, puesto que ‘Fuerte’ parece no tratarse de un polinizador ideal para el cultivar Hass, debido al hecho de que sus etapas de floración no se solapan lo suficiente para asegurar una polinización efectiva de ‘Hass’, habiéndose recomendado en otras zonas geográficas el uso de otros polinizadores como ‘Bacon’ cuya floración presenta mayor solape con ‘Hass’ y contribuye a una mayor retención de fruta tanto en California (Vrecenas-Gadus y Ellstrand, 1985) como en España (Hormaza, 2003). Del mismo modo, tras comparar el uso de unos polinizadores alternativos para el cultivar Hass (‘Marvel’ y ‘Nobel’) en nuestras condiciones de cultivo sureste español se ha puesto de manifiesto que la retención de frutos obtenidos mediante cruzamientos con estos polinizadores es superior a la obtenida con ‘Fuerte’ (Capítulo 7).





# **7 SELECCIÓN DE POTENCIALES POLINIZADORES PARA EL CULTIVAR ‘HASS’ EN EL SURESTE ESPAÑOL EN BASE AL SOLAPE DE SUS ETAPAS DE FLORACIÓN Y ESTADÍOS SEXUALES**

## **RESUMEN**

La producción de aguacate depende de un fenómeno peculiar conocido como dicogamia protogínica, el cual favorece la fecundación cruzada. El objetivo principal de este trabajo consiste en la búsqueda de polinizadores potenciales para el genotipo ‘Hass’, el de mayor importancia a nivel mundial. Con esta finalidad, durante dos años consecutivos se realizaron seguimientos para determinar la etapa de floración en 27 genotipos de aguacate. La duración media de la etapa de floración es de 45 días, oscilando desde 18 días para el genotipo ‘Harvest’ a 50 días en el caso del cultivar Fuerte. Los genotipos que presentan una floración más temprana son ‘Fuerte’ y ‘Shepard’ que florecen durante la tercera semana de marzo. Los genotipos que presentan una etapa de floración más tardía, como ‘Colin V-33’, ‘Adi’, ‘OA 184’ y ‘Harvest’, florecen durante la segunda semana del mes de abril. La etapa de floración de ‘Hass’ se extiende desde la primera semana del mes de abril hasta la segunda semana de mayo, siendo su duración aproximadamente de 30 días. Puesto que un buen polinizador para el cultivar ‘Hass’ debe presentar no solo suficiente solape con su etapa de floración, sino además solape entre sus estados sexuales, se estudió el estado sexual a lo largo del día cada dos horas durante la etapa de floración en 12 genotipos que producen frutos similares a ‘Hass’. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que ‘Marvel’ (BL 516) y ‘Nobel’ (BL 667) presentan un alto solape sexual con ‘Hass’. Teniendo en cuenta la duración de la etapa de floración, el solape entre estados sexuales y el cuajado, estos genotipos podrían ser interesantes como polinizadores para ‘Hass’ en nuestras condiciones de cultivo.

---

ALCARAZ, M.L., J.I. HORMAZA (2009) Selection of potential pollinizers for ‘Hass’ avocado based on flowering time and male-female overlapping. *Scientia Horticulturae* (en prensa). ANEXO II.



## INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un frutal subtropical de hoja perenne nativo de Centroamérica y Méjico donde fue domesticado y cultivado desde tiempos remotos (Galindo-Tovar et al., 2008; Chen et al., 2009). Se engloba en la familia de las Lauráceas junto con otras especies mayoritariamente tropicales o subtropicales. Las Lauráceas (orden Laurales) se incluyen en el complejo Magnoliid, dentro de las angiospermas basales. Tradicionalmente, se han descritos varios ecotipos geográficos o variedades botánicas adaptadas a diferentes condiciones ecoclimáticas y que se consideran de interés agronómico: Mejicana [*P. americana* var. *drymifolia* (Schlecht. & Cham.) Blake], Guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis* L. Wms.) y Antillana (*P. americana* var. *americana* Mill.). Estas razas se distinguen en base a caracteres morfológicos, fisiológicos y agronómicos (Berg, 1995; Berg y Lahav, 1996; Chanderbali et al., 2008). Así, mientras que las razas Mejicana y Guatemalteca están adaptadas a climas más frescos, la raza Antillana requiere de climas más cálidos para un desarrollo óptimo. La mayoría de los cultivares comerciales son híbridos entre razas obtenidas a partir de semillas. El genotipo más cultivado a nivel mundial es ‘Hass’, que se trata de un híbrido Guatemalteco x Mejicano que produce frutos de piel oscura.

La producción mundial de aguacate ha superado los 3 millones de toneladas, aunque el 70% de esta producción se debe a unos pocos países (México, Indonesia, Estados Unidos, Colombia, Brasil, Chile, La República Dominicana y Perú), siendo Méjico el principal país productor con una producción superior al millón de toneladas, lo que supone el 30% de la producción mundial de aguacate (Faostat, 2009). España supone un caso peculiar en el cultivo del aguacate, puesto que es el único país europeo con una producción importante (aproximadamente 85.000 t en 2007, Faostat, 2009) limitada a la costa del sureste de Andalucía y las Islas Canarias. Este frutal fue introducido en España a comienzos del siglo XVI, aunque su expansión comercial tuvo lugar en la década de 1970.



El aguacate se caracteriza por una marcada dicogamia protogínica que favorece la fecundación cruzada. A pesar de presentar flores hermafroditas, los órganos masculinos y femeninos no son funcionales al mismo tiempo. Cada flor abre dos veces, la primera vez con un estigma receptivo y de color blanquecino siendo funcionalmente femenina; después esta flor se cierra y se abre de nuevo el día siguiente siendo funcionalmente masculina con un estigma no receptivo y las anteras dehiscentes. Los diferentes cultivares de aguacate se clasifican en tipo A o B en base a su comportamiento floral (Nirody, 1992). En los cultivares de tipo A las flores abren en estado femenino por la mañana, cierran a mediodía y vuelven a abrirse la tarde del día siguiente en estado masculino. En el caso de los cultivares de tipo B, la apertura de la flor en estado femenino tiene lugar por la tarde, se cierra al anochecer para abrirse la mañana siguiente en estado masculino (Stout, 1923). La combinación de la dicogamia protogínica y los distintos comportamientos florales dificultan la autofecundación y favorecen la fecundación cruzada. Sin embargo, la autofecundación tiene lugar en parcelas monovarietales probablemente debido al solape entre los estadios masculino y femenino en la misma flor, entre flores del mismo árbol, o entre flores de árboles del mismo genotipo.

Un problema frecuente en las plantaciones comerciales de aguacate es la baja tasa de cuajado de este frutal cuando se compara con la población inicial de flores; así, el cuajado puede variar desde 0,001% hasta 0,23% (Sedgley, 1980) considerándose como buena una producción de 300 frutos por árbol (Lahav y Zamet, 1999). El ciclo floral es previsible bajo condiciones óptimas pero es muy sensible a las condiciones ambientales, principalmente a la temperatura (Lesley y Bringhursts, 1951; Sedgley, 1977b; Sedgley y Annells, 1981; Ish Am y Eisikowith, 1991). La sensibilidad del ciclo floral a las condiciones ambientales es variable en función del cultivar y, en general, los cultivares de tipo B muestran una mayor sensibilidad a las bajas temperaturas que los cultivares de tipo A (Sedgley y Grant, 1983).

A pesar del alto porcentaje de autofecundación obtenido bajo diferentes condiciones ambientales (Davenport, 1986, 1994, 1999, 2006), diversos estudios



moleculares de la composición genética de la progenie obtenida ponen de manifiesto que la mayoría de los frutos que alcanzan la madurez son resultado de fecundación cruzada (Vrecenas-Gadus y Ellstrand, 1985; Degani et al., 1986, 1989, 1997, 2003; Goldring et al., 1987; Robbertse et al., 1997; Chen et al., 2007; Borrone et al., 2008). Por ello, tradicionalmente se ha considerado que la plantación de cultivares complementarios incrementa significativamente la producción (Bergh y Garber, 1964; Vrecenas-Gadus, 1985; Degani et al., 1997) aunque el efecto de la tasa de la fecundación cruzada en la producción final es aún un tema de gran controversia (Garner et al., 2008). La diferencia entre el elevado porcentaje de autofecundación inicial y la baja proporción de frutos autofecundados que alcanzan la madurez se ha explicado por la caída selectiva de frutos procedentes de autofecundación frente a aquellos derivados de fecundación cruzada (Degani et al., 1986; Robbertse et al., 1997) o por diferencias en el porcentaje de óvulos fecundados con polen del mismo genotipo y con polen de diferentes genotipos (Sedgley, 1979; Robbertse et al., 1994, 1995; Borrone et al., 2008).

Por lo tanto, existen evidencias que sugieren que el interplantar cultivares complementarios podría ser importante para asegurar una buena cosecha. Sin embargo, dependiendo de la producción y del precio final en el mercado de la fruta obtenida del cultivar empleado como polinizador, podría reducirse la rentabilidad de la producción. El cultivar más importante desde el punto de vista comercial en España, al igual que en la mayoría de los países productores, es 'Hass' que supone el 75% de la producción, siendo 'Fuerte' el cultivar polinizador más común. Sin embargo, actualmente 'Fuerte' es menos interesante a nivel comercial que 'Hass' por lo que la utilización de polinizadores con frutos similares a los de 'Hass' podría ser muy ventajoso. Por ello, el objetivo de este trabajo consiste en caracterizar la fenología de la floración así como el ciclo floral diario de los posibles polinizadores más prometedores, conservados en nuestra colección de germoplasma, bajo las condiciones ambientales del sureste de España. Además se han caracterizado con mayor detalle aquellos genotipos que presentan suficiente solape en su etapa de floración con la de 'Hass' y



producen frutos tipo 'Hass'. Finalmente, se analizó el efecto de tres polinizadores en el cuajado final en nuestras condiciones de cultivo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Condiciones climáticas**

En la Península Ibérica, el aguacate se cultiva en el litoral andaluz (provincias de Málaga y Granada). Los datos recogidos en los últimos 40 años en la Mayora (36° 45'N) muestran una temperatura media anual de 19,4°C con un valor medio de 29,4°C durante el mes más cálido (agosto) y un valor medio de 9,3°C en el mes más frío (enero) con una precipitación media anual de 435 mm.

### **Material vegetal y etapa de floración**

En este trabajo se emplearon 27 genotipos de aguacate conservados en la colección de aguacate de la E.E. La Mayora que incluye genotipos de tipo A y B (Tabla 1).

Durante 2005 y 2006 se determinó la duración de la etapa de floración, definida como el número de días transcurridos desde la apertura de la primera flor hasta el cierre de la última (Elzinga et al., 2007) en los 27 genotipos estudiados. El momento de plena floración se estimó cuando el 50% de las flores estaban abiertas.

**Tabla 1.** Lista de las 27 variedades de aguacate estudiadas para determinar la fenología de la floración.

GENOTIPOS	Grupo floral	GENOTIPOS	Grupo floral
5-552	B <sup>4</sup>	LAMB HASS (BL122)	A <sup>2</sup>
ADI	A <sup>1</sup>	LOHNEISS	A <sup>2</sup>
COLIN V-33	B <sup>1</sup>	MARVEL (BL516)	B <sup>1</sup>
EDEN	A <sup>3</sup>	NEGRA DE LA CRUZ	B <sup>1</sup>
FUERTE	B <sup>1</sup>	NOBEL (BL667)	B <sup>1</sup>
FUNDACIÓN II	A <sup>2</sup>	OA 184	B <sup>7</sup>
H670	A <sup>2</sup>	PINKERTON	A <sup>1</sup>
GEM (3-29-5)	A <sup>1</sup>	REGAL	A <sup>5</sup>
HARVEST	A <sup>4</sup>	RINCOATL	A <sup>1</sup>
HASS	A <sup>2</sup>	RT 5176	B <sup>5</sup>
HASS MOTRIL	A <sup>2</sup>	SHEPARD	B <sup>6</sup>
IRIET	B <sup>1</sup>	SIR PRIZE	B <sup>1</sup>
JIMÉNEZ 1	A <sup>2</sup>	TACAMBARO	A <sup>2</sup>
JIMÉNEZ 2	A <sup>2</sup>		

<sup>1</sup> <http://www.ucavo.ucr.edu>

<sup>2</sup> Este trabajo

<sup>3</sup> Lavi et al., 1997

<sup>4</sup> Arpaia et al., 2005

<sup>5</sup> Martin y Bergh, 1993

<sup>6</sup> Newett et al., 2002

<sup>7</sup> Witney y Martin, 1995

### Seguimiento del ciclo floral

El ciclo floral se observó diariamente en dos árboles de 12 genotipos: ‘Hass’, ‘Fuerte’ y 10 genotipos que producen frutos similares a los de ‘Hass’, con el objeto de comparar el solape entre el estado masculino de los posibles polinizadores (‘Nobel’ –BL667-, ‘Marvel’ -BL516-, ‘Tacámbaro’, ‘Lohneiss’, ‘Gem’ -3-29-5-, ‘Lamb Hass’ -BL122-, ‘Jiménez 2’, ‘Jiménez 1’, ‘H670’, ‘Hass Motril’, ‘Hass’ y ‘Fuerte’) y el estado femenino de ‘Hass’. El comportamiento floral de cada genotipo se observó cada dos horas desde las 8:00 hasta las 20:00, contando las flores en estado masculino y femenino en 10 inflorescencias localizadas en diferente posición en el árbol.

Por otra parte, para estudiar el ciclo floral bajo nuestras condiciones de cultivo, se marcaron diariamente, durante toda la etapa de floración, 20 flores (10 por árbol) de ‘Hass’ y de 3 genotipos tipo B (‘Marvel’, ‘Nobel’, ‘Fuerte’)



anotando la fecha de la primera apertura y se observaron hasta el momento de la segunda apertura.

### **Eficiencia de los polinizadores en campo**

Para comparar el efecto de tres polinizadores en el cuajado de ‘Hass’ se llevaron a cabo una serie de polinizaciones. La selección de los donadores de polen empleados en este estudio se basó en los resultados obtenidos durante el seguimiento del ciclo floral y los genotipos empleados fueron ‘Nobel’ y ‘Marvel’ junto a ‘Fuerte’ (el cultivar más empleado como polinizador en el sureste español). Se polinizaron manualmente un total de 500 inflorescencias distribuidas en 25 árboles del cultivar ‘Hass’ de tal forma que en cada inflorescencia se polinizaron tres flores, usando un donador de polen para cada una de ellas. Las flores en estado masculino de los cultivares seleccionados se recogieron a las 12:00 y el polen fue aplicado inmediatamente por contacto directo de las anteras con el estigma. El resto de las flores de la inflorescencia se eliminaron. Se llevaron a cabo seguimientos semanales de las flores y/o frutos retenidos por el árbol, anotándose la fecha de abscisión y calculando el cuajado final. El porcentaje de cuajado obtenido empleando los distintos polinizadores se comparó mediante una prueba Chi cuadrado para tablas de contingencia 2x2 a la que se le aplicó la corrección de continuidad de Yates. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 15 (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

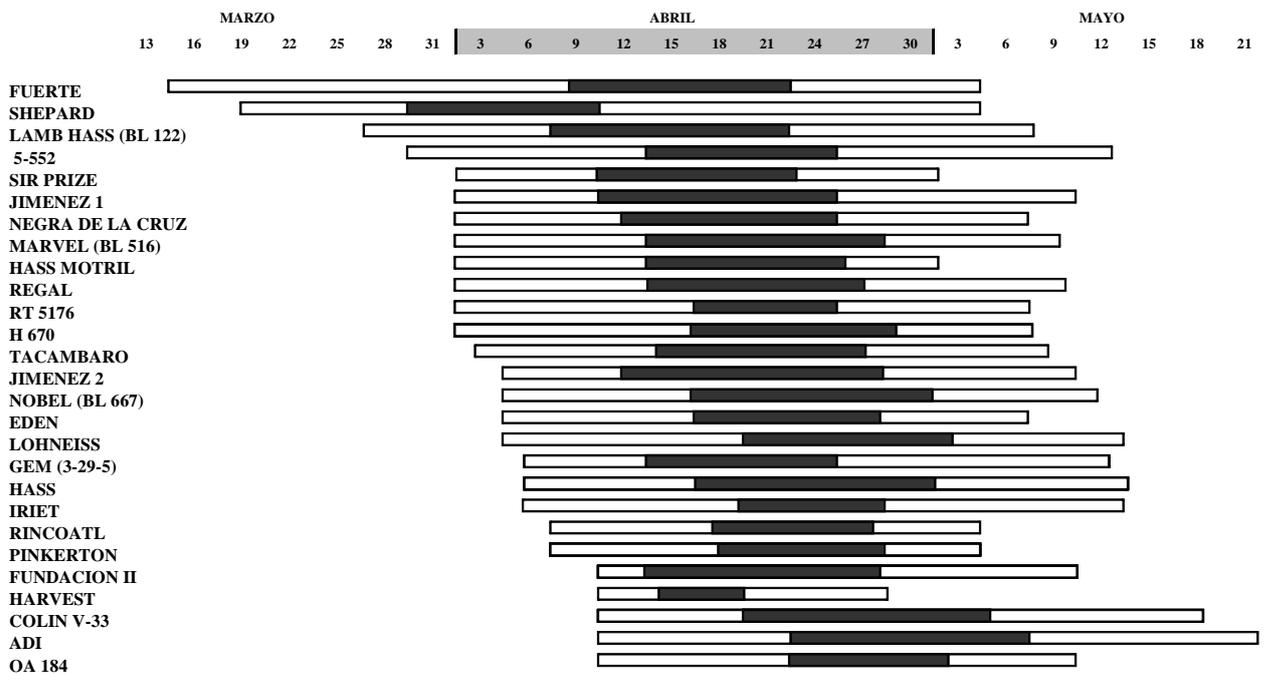
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Fenología de la floración**

El seguimiento de la fenología de la floración durante dos años consecutivos mostró que el periodo de floración en los genotipos estudiados osciló desde 18 días en el caso de ‘Harvest’ a 50 días para ‘Fuerte’ y el periodo



de plena floración varió de 1 a 2 semanas en la mayoría de los genotipos (Figura 1). La duración de la etapa de floración fue muy similar durante los dos años de estudio, aunque en el año 2006 el comienzo de la floración se adelantó una semana en la mayoría de los cultivares con respecto al año anterior. En este trabajo se pudieron distinguir dos genotipos que presentaban una etapa de floración más temprana (‘Fuerte’ y ‘Shepard’), cuyas flores empezaron a abrirse en marzo, y otros genotipos con una floración más tardía (‘Harvest’, ‘Colin V-33’, ‘Fundación II’, ‘OA 184’ y ‘Adi’) que florecieron a mitad del mes de abril. Sin embargo, la mayoría de los genotipos florecieron en el mes de abril en sincronía con ‘Hass’. En la Figura 1 se muestra esquemáticamente la etapa de floración de los genotipos estudiados.



**Figura 1.** Etapa de floración de 27 genotipos de aguacate. En negrita se muestra el periodo de plena floración.

La etapa de plena floración para la mayoría de los genotipos ocurrió en abril, presentando un gran solape con ‘Hass’. Sin embargo, el cultivar Fuerte, que se emplea como polinizador para ‘Hass’ en España, sólo muestra solape con ‘Hass’ durante las dos primeras semanas de su floración; por este motivo sería muy interesante la búsqueda de polinizadores adicionales que aseguraran una



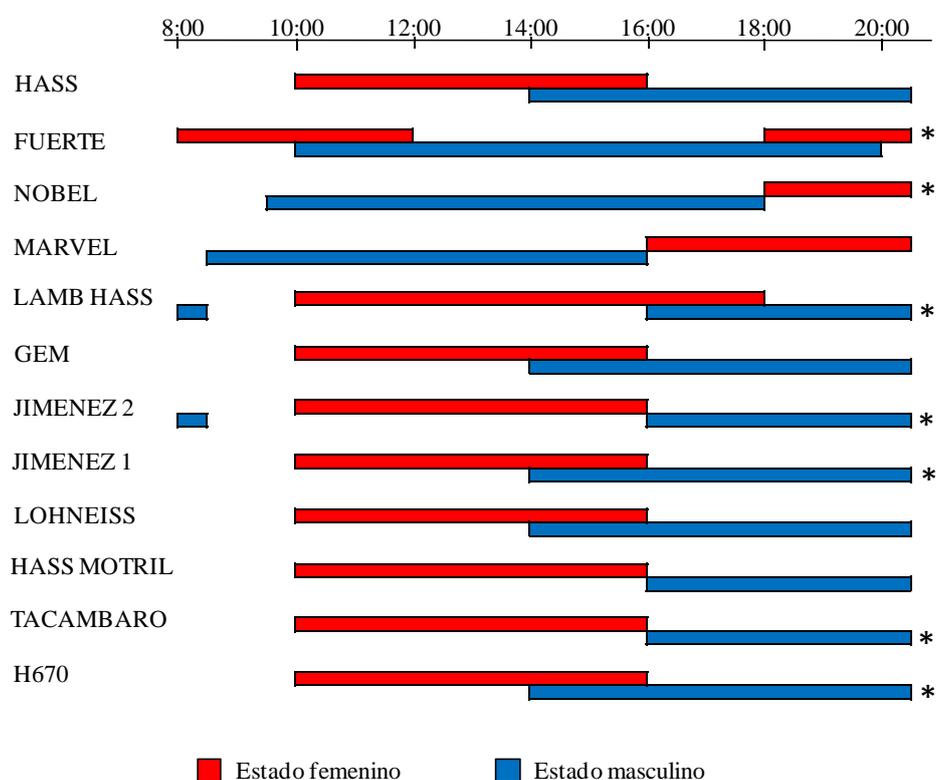
polinización efectiva para el cultivar ‘Hass’ durante la segunda mitad de su floración.

### **Ciclo floral diario**

Con la finalidad de establecer una posible complementación entre estados florales, se llevaron a cabo seguimientos diarios del ciclo floral en ‘Hass’, ‘Fuerte’ y en 10 genotipos con frutos tipo ‘Hass’. A pesar de que el aguacate se ha descrito como una especie con una marcada dicogamia protogínica, es frecuente la coexistencia de flores en distintos estados sexuales en el mismo árbol o entre árboles del mismo genotipo. Este solape existe a lo largo de toda la etapa de floración, siendo más intenso al comienzo y al final de la floración; de esta forma, se puede explicar la producción en plantaciones monovarietales (Davenport, 1989; Davenport et al., 1994). Así, aunque la dicogamia incrementa la oportunidad de fecundación cruzada, reduciéndose mediante este mecanismo la endogamia, la coexistencia de flores en estado masculino y femenino podría ser considerada como una estrategia para asegurar la fecundación y la producción cuando las oportunidades de fecundación cruzada son limitadas.

Durante el periodo de plena floración, las flores de los genotipos de tipo B estudiados (‘Fuerte’, ‘Nobel’ y ‘Marvel’) abrieron en estado masculino entre las 8:00 y las 10:00 (Figura 2) y a las 12:00 tenía lugar la dehiscencia de las anteras. En trabajos anteriores se ha puesto de manifiesto que ‘Fuerte’ muestra un alto grado de solape entre flores en estado masculino y femenino dentro de la misma inflorescencia (Nirody, 1922). Del mismo modo, en nuestro trabajo se observó este alto grado de coexistencia entre ambos estados dentro de un mismo árbol desde las 10:00 hasta las 12:00 y desde las 18:00 hasta 20:00, mientras que no se encontró solape en el caso de ‘Marvel’ ni en el de ‘Nobel’. Las flores en estado masculino cerraban por la tarde y las flores en estado femenino lo hacían al anochecer, excepto en el caso de ‘Fuerte’ en el que las flores en estado femenino abrían más tarde y muchas de ellas continuaban abiertas durante la noche hasta la mañana siguiente, siendo frecuente la coexistencia de flores en estado masculino

y en estado femenino. Durante la etapa de plena floración, las flores de los genotipos de tipo A estudiados ('Hass', 'Lamb Hass', 'Gem', 'Jiménez 1', 'Jiménez 2', 'Hass Motril', 'Lohneiss', 'Tacámbaro' y 'H670') abrían en estado femenino a las 10:00 y permanecían abiertas hasta las 16:00 (18:00 en el caso de 'Lamb Hass'). El solape entre flores en estado femenino cerrándose y flores en estado masculino abriendo ocurría en 'Hass', 'Gem', 'Jiménez 1' y 'H670' entre las 14:00 y 16:00; en 'Lamb Hass' el solape tiene lugar entre las 16:00 y las 18:00, mientras que no se encontró solape en el caso de 'Jiménez 2', 'Hass Motril' y 'Tacámbaro', excepto al final de la etapa de floración.

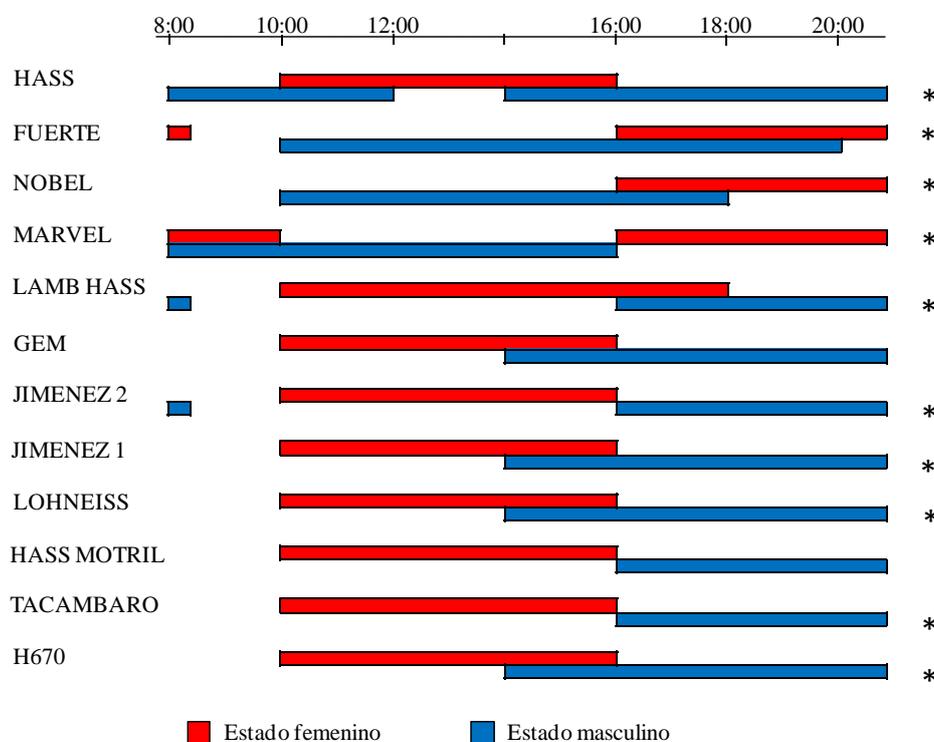


**Figura 2.** Esquema de los estados sexuales en las distintas variedades estudiadas en su momento de plena floración. El asterisco indica que las flores permanecían abiertas en el último seguimiento.

Durante la floración de 'Hass' fue evidente una amplia variación en el comportamiento floral diario principalmente al comienzo y al final de la etapa de floración. Así, al comienzo de la floración las flores abrían en estado femenino a las 10:00 y cerraban a las 16:00 mientras que las flores abrían en estado



masculino a las 14:00 y permanecían en este estado durante la noche y cerraban entre las 10:00 y las 12:00 del día siguiente. En este periodo encontramos solape entre estados masculino y femenino durante cuatro horas: 10:00-12:00 y 14:00-16:00. Cuando comparamos a ‘Marvel’ con ‘Hass’, observamos que tenían una etapa de floración similar y el estadio sexual masculino de ‘Marvel’ se solapaba con el femenino de ‘Hass’ durante las primeras horas de la mañana, aunque la dehiscencia de las anteras ocurría a las 12:00 (Figura 3). Al final de la etapa de floración, tanto los genotipos de tipo A como los de tipo B mostraron una reducción en la duración del ciclo floral, las flores en estado femenino abrían a las 12:00 y las flores en estado masculino cerraban antes de las 20:00 (Figura 4).



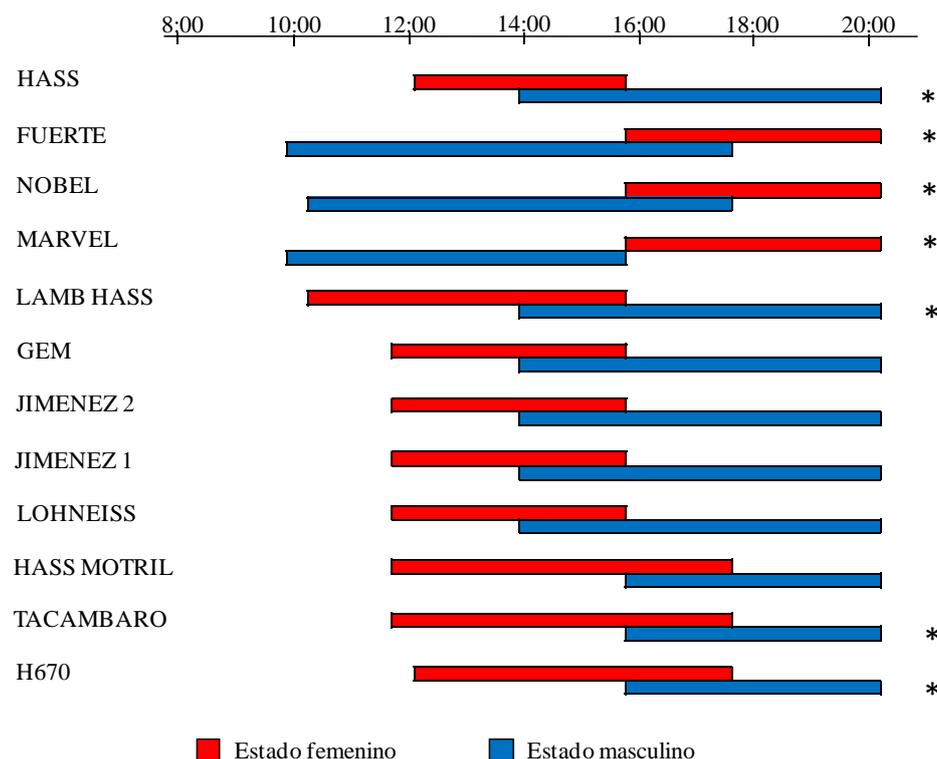
**Figura 3.** Esquema de los estados sexuales en las 27 variedades estudiadas al comienzo de la floración. El asterisco indica que las flores permanecían abiertas en el último seguimiento.

Por otra parte, mientras que los genotipos de tipo A mostraron un comportamiento similar al descrito por primera vez por Nirody (1922), el ciclo floral de los genotipos de tipo B, bajo nuestras condiciones de cultivo, no siguió el ciclo normal descrito en trabajos anteriores. Así, las flores abrían en estado femenino por la tarde, permaneciendo la mayoría de ellas abiertas por la noche y



parte de la mañana del día siguiente, solapándose con aquellas en estado masculino que abrieron por primera vez en estado femenino dos días antes. Un comportamiento similar fue descrito por Lesley y Brighurst (1951) cuando las temperaturas diarias oscilaban entre 18 y 21°C y las nocturnas entre 7 y 12°C. En nuestras condiciones de cultivo el rango de temperaturas diurnas osciló entre 17,5°C a 27,5°C en 2005 y desde 18,5°C a 25°C en 2006 (con un valor medio de 21,6°C y de 21,4°C respectivamente). Así, nuestros resultados corroboran trabajos anteriores en los que se describe la mayor sensibilidad de los genotipos de tipo B a las bajas temperaturas (Lesley y Brighurst, 1951; Sedgley, 1977; Sedgley y Annell, 1981; Sedgley y Grant, 1983).

El ciclo anteriormente descrito fue el observado bajo condiciones normales en el periodo de floración. Sin embargo, durante este periodo, nos encontramos con varios días nublados en los que tuvo lugar un descenso de la temperatura, oscilando desde 4 días en el primer año a 7 en el segundo. En estos días, caracterizados por un descenso tanto en la temperatura nocturna como diurna, el comportamiento floral se alteró. Así bajo condiciones de bajas temperaturas, 'Hass' mostraba un retraso y un alargamiento en su ciclo floral; las flores en estado femenino abrían a mediodía y cerraban aproximadamente a las 18:00, mientras que las flores en estado masculino abrían al anochecer y permanecían abiertas hasta mediodía del día siguiente. Así, la segunda apertura tenía lugar el tercer día después de la primera apertura. Bajo estas condiciones, las flores de los cultivares de tipo B abrían en estado femenino por la tarde, muchas de ellas cerraban por la noche y otras permanecían abiertas durante la mañana del día siguiente, coexistiendo con flores en estado masculino que habían abierto por primera vez en estado femenino tres días antes. Las flores en estado femenino abrían en estado masculino el cuarto día después de la primera apertura. Similares alteraciones del ciclo se han descrito en otros trabajos anteriores (Stout, 1923; Robinson, 1931; Lesley y Brighurst, 1951; Papademetriou, 1976; Sedgley, 1987).



**Figura 4:** Diagrama de solape entre estados sexuales en distintas variedades al final de sus etapas de floración. El asterisco indica que las flores permanecían abiertas en el último seguimiento.

### Diferencias en el cuajado final

Tras las polinizaciones manuales empleando distintos donadores de polen se pusieron de manifiesto diferencias significativas en la retención de frutos. Así, el cuajado final fue de 2,8%, 7,4% y 8,4% empleando como donadores de polen ‘Fuerte’, ‘Marvel’ y ‘Nobel’ respectivamente. No se obtuvieron diferencias significativas en el cuajado obtenido polinizando con ‘Marvel’ y con ‘Nobel’ ( $p=0,558$ ), mientras que sí hubo importantes diferencias al comparar el cuajado obtenido con ‘Fuerte’ con respecto a ‘Nobel’ ( $p<0,001$ ) y ‘Marvel’ ( $p=0,001$ ). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el cuajado final así como los datos de solape en el ciclo floral, podríamos plantearnos el hecho de que ‘Fuerte’ es menos eficiente que los otros dos polinizadores para el cultivar ‘Hass’ en nuestras condiciones de cultivo. Distintos factores como la diferencia en la viabilidad del polen o diferencias en el crecimiento de los tubos polínicos durante



la fase progámica y /o el aborto diferencial de embriones a nivel postzigótico podrían ser los responsables de las diferencias obtenidas en los porcentajes de cuajado.

## **Conclusión**

La polinización se considera un factor limitante en la producción de las plantaciones comerciales de aguacate (Vithanage, 1990; Ish Am y Eisikowitch, 1991). Teniendo en cuenta la fenología floral, el solape entre estadios sexuales y el cuajado observado polinizando manualmente, una posible alternativa al uso de ‘Fuerte’ como polinizador principal en plantaciones comerciales en España podría ser la combinación de algunos árboles de ‘Fuerte’, que podrían garantizar la polinización efectiva de ‘Hass’ durante las primeras semanas de la floración, con otros genotipos de tipo B como ‘Nobel’ y ‘Marvel’ que asegurarían la polinización durante las últimas semanas. Este sistema de plantación mixto de dos o más genotipos podría ser ventajoso disminuyendo el posible efecto negativo de la carencia de sincronía entre los genotipos dependiendo de las condiciones ambientales. Este sistema mixto podría llevarse a cabo en otras regiones de cultivo con la finalidad de optimizar la fecundación cruzada. Sin embargo, sería necesario continuar con estudios en los nuevos cultivares para poder dar una respuesta definitiva a la influencia de la fecundación cruzada sobre el cuajado en nuestras condiciones de cultivo.



# **Discusión general**





## DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido avanzar en el conocimiento de la biología reproductiva del aguacate y ponen de manifiesto la variedad de factores implicados en el cuajado final en esta especie. Por un lado, la fase progámica muestra una alta vulnerabilidad a las condiciones ambientales, especialmente a la temperatura, que afecta tanto al comportamiento del polen como al pistilo. Además, las reservas nutritivas de la flor parecen jugar un papel determinante condicionando el cuajado. Los resultados obtenidos tienen claras implicaciones agronómicas ya que pueden permitir rediseñar las plantaciones con la utilización de polinizadores alternativos.

### **La polinización como factor limitante**

La polinización es el primer paso que desencadena toda una serie de procesos que conducen a la fecundación y a la posterior fructificación. La producción de aguacate bajo determinadas condiciones ambientales se puede ver favorecida por la presencia de un polinizador de grupo floral complementario que garantice su polinización efectiva debido a la dicogamia protogámica que caracteriza a esta especie. Este cultivar complementario debe presentar una etapa de floración que muestre suficiente solape con la etapa de floración del cultivar principal y, además, debe existir solape entre los estadios sexuales.

La mayoría de los genotipos de aguacate analizados en este trabajo iniciaron su etapa de floración en el mes de abril, aunque encontramos un grupo de ellos más tempranos que florecen en el mes de marzo, y otros más tardíos que lo hacen a final de abril. El cultivar más ampliamente empleado como polinizador para 'Hass' en nuestra zona de cultivo es 'Fuerte', cuya floración comienza a mitad del mes de marzo y termina aproximadamente a mediados de abril; así, su etapa de floración no presenta suficiente solape con la de 'Hass' por lo que no garantiza la polinización efectiva de 'Hass' durante las últimas semanas de la floración de éste ni durante su periodo de plena floración. Otro



inconveniente que muestra ‘Fuerte’ es que su ciclo floral muestra gran susceptibilidad a las condiciones ambientales unido a que es de producción alternante. Introducir en las plantaciones comerciales una serie de polinizadores adicionales sería de gran interés para asegurar la polinización efectiva de ‘Hass’ durante toda su etapa de floración. En este trabajo se ha puesto de manifiesto que, en base a la duración de la etapa de floración y al solape entre estadios sexuales, ‘Nobel’ (BL667) y ‘Marvel’ (BL516) podrían ser potenciales polinizadores de interés para el cultivar Hass.

La polinización es el primer factor limitante en la producción con el que nos encontramos en la fase reproductiva, puesto que se han observado diferentes tasas de cuajado en poblaciones polinizadas manualmente con respecto a aquellas dejadas a libre polinización. Aunque la polinización tenga lugar, se producen una serie de caídas prematuras de flores y de frutos en desarrollo después del momento de antesis, que reducen considerablemente su número inicial, por lo que la caída y el cuajado de las flores vienen, además, determinados por la fecundación y por otros factores intrínsecos a la flor.

Un factor limitante añadido en la producción del aguacate es la alternancia de años de alta producción con años de baja producción, no observándose diferencias en la tasa de cuajado ni en poblaciones de flores polinizadas ni en aquellas dejadas a libre polinización en ambos años, por lo que la diferencia en la producción en la costa Mediterránea andaluza al igual que en California (Garner y Lovatt, 2008), radicaría principalmente en el número de flores producidas. Independientemente de que se trate de un año de alta o de baja producción, la floración es exuberante y esto podría tratarse de un mecanismo de atracción de los insectos. La ubicación de una cantidad adecuada de colmenas en las plantaciones resulta indispensable para garantizar una adecuada producción. Estas colmenas deberían colocarse idealmente durante toda la etapa floración de ‘Hass’, siendo especialmente importantes durante la segunda y tercera semana del mes de abril de los años de alta producción, puesto que en este periodo tiene lugar la apertura del mayor porcentaje de flores.



### **Diferencias en la germinación de polen *in vivo* e *in vitro***

Uno de los factores que juega un importante papel en el éxito reproductivo es el comportamiento del gametofito masculino, que muestra gran susceptibilidad a las condiciones ambientales. Aquellos genotipos cuyos tubos polínicos presenten ventajas en su crecimiento serán los que se vean mejor representados en la descendencia (Mulcahy y Mulcahy, 1975; 1987, Mulcahy, 1979; Hormaza y Herrero, 1992; 1996). En este trabajo se ha optimizado un medio de germinación *in vitro* para polen de aguacate que ha permitido analizar el comportamiento de distintos genotipos frente a diferentes temperaturas. En este caso no encontramos un efecto de la temperatura en el porcentaje de germinación *in vitro* en los genotipos analizados, con la excepción de un único genotipo ('Maoz') en el que el porcentaje de germinación aumentó. Este genotipo es de raza antillana, con lo que se pudo establecer una relación entre la raza botánica y la temperatura óptima para la que se consigue el máximo porcentaje de germinación. Por tanto, los genotipos de raza antillana no serían adecuados como polinizadores en nuestras condiciones de cultivo mientras que el resto de los genotipos empleados en este trabajo no mostraron variaciones en la germinación de polen *in vitro* bajo las diferentes condiciones de temperaturas estudiadas, lo que sugiere que estos genotipos se adaptan bien a las condiciones de temperatura existentes en la etapa de floración mostrando un porcentaje de germinación óptimo entre 20 y 30°C. Además también se ha puesto de manifiesto un efecto de la temperatura sobre la longitud de los tubos polínicos *in vitro*. Bajo las condiciones de temperatura existentes en nuestra zona de cultivo el efecto de la temperatura sobre el comportamiento del gametofito masculino no va a ser limitante en la producción y aquellos genotipos de raza Mejicana y Guatemalteca o híbridos entre ambas razas podrían ser eficientes como polinizadores.

Puesto que diferencias entre genotipos en la germinación y crecimiento del tubo polínico conducen a diferencias en el éxito reproductivo, el conocimiento del estado de competición bajo las condiciones ambientales predominantes durante la etapa de floración resulta fundamental para optimizar



la producción en plantaciones comerciales, especialmente con las perspectivas actuales de cambio global (Hedhly et al., 2009).

En este trabajo se ha puesto de manifiesto la diferencia del porcentaje de germinación *in vivo* e *in vitro* en el caso del cultivar Fuerte, siendo significativamente superior *in vivo*. El porcentaje de germinación *in vitro* obtenido para 'Fuerte' en este trabajo ha sido similar al que había sido descrito previamente (Sahar y Spiegel, 1984; Papademetriou et al., 1997). Además en este trabajo se han encontrado diferencias en el porcentaje de germinación entre distintos genotipos, lo que hace suponer que es necesario la optimización del medio para cada uno de los cultivares.

### **El incremento de la temperatura acorta el periodo efectivo de polinización**

El periodo efectivo de polinización adquiere gran importancia condicionando el cuajado y viene determinado por tres eventos: receptividad estigmática, cinética del tubo polínico y longevidad del óvulo. Este periodo puede ser variable en función de las condiciones ambientales, adquiriendo la temperatura gran importancia puesto que en diferentes especies se ha descrito que afecta a la receptividad estigmática (Burgos et al., 1991; Egea et al., 1991; Kumar et al., 1995; Hedly et al., 2003), la germinación y el posterior crecimiento del tubo polínico (Lewis, 1942; Williams, 1970; Elgersma et al., 1989; Hedhly et al., 2004; Kakani et al., 2005), la longevidad del óvulo (Tompson y Liu, 1973; Stösser y Anvari, 1982; Postweiler et al., 1985) y el cuajado (Jackson y Hamer, 1980; Mellenthin et al., 1972; Vasilakakis y Porlingis, 1985). Así, las altas temperaturas aceleran el crecimiento del tubo polínico y la degeneración del estigma (Egea et al., 1991; Burgos et al., 1991; Hedly et al., 2003), y del óvulo (Cerovic y Ruzic, 1992; Postweiller et al., 1985).

A pesar del interés que presenta la duración del periodo efectivo de polinización en aguacate, no se tiene información clara del efecto de las condiciones ambientales sobre el periodo efectivo de polinización. La temperatura juega un importante papel en distintas especies condicionando la



duración del periodo efectivo de polinización (revisado en Sanzol y Herrero, 2001). En aguacate, las temperaturas afectan tanto al porcentaje de germinación de los granos de polen como a la adhesión siendo las condiciones de temperatura óptimas para la germinación del polen entre 20 y 25°C tanto en las flores en estadio masculino como en las femeninas. Cuando se incrementa la temperatura, la receptividad estigmática se muestra reducida en el estadio masculino.

Además la humedad relativa también juega un importante papel en la duración de la receptividad estigmática, de tal forma que humedades relativas comprendidas entre 75 y 95% permiten ampliar la receptividad estigmática incluso cuando la flor abre siendo funcionalmente masculina, evitando la desecación del estigma en el estadio masculino.

Además, el incremento de la temperatura se ve reflejado en la aceleración del crecimiento del tubo polínico reduciendo el tiempo en el que el tubo polínico alcanza el óvulo, aunque la temperatura no afecta al número final de tubos polínicos que alcanzan la base del estilo. Por otra parte, las condiciones de bajas temperaturas estudiadas retrasan el crecimiento del tubo polínico aumentando el tiempo requerido para que el tubo polínico alcance el óvulo ya que 48 horas después de la polinización no se observó ningún evento de fecundación. Estos resultados pueden explicar la baja tasa de cuajado obtenida en aquellos periodos de polinización caracterizados por bajas temperaturas.

Por otra parte, el comportamiento floral del aguacate muestra una gran susceptibilidad a las condiciones ambientales, principalmente a la temperatura (Ish Am y Eisikowith, 1991; Sedgley, 1977b; Sedgley y Annells, 1981). En nuestras condiciones de cultivo, la alteración del ciclo floral ocurre frecuentemente al comienzo y al final de la etapa de floración; al comienzo de la floración fue evidente una prolongación del ciclo floral mientras que al final de la etapa de floración el ciclo se acorta considerablemente. Estas variaciones pueden ser debidas a las condiciones de temperatura, puesto que al principio de la floración las temperaturas son más bajas que las encontradas al final de la etapa de floración. Durante toda la etapa de floración fue frecuente la coexistencia de



flores en estado masculino y flores en estado femenino en un mismo árbol o entre árboles de la misma variedad durante al menos dos horas, por lo que la autopolinización puede tener lugar durante este periodo de tiempo.

En las distintas condiciones de humedad relativa y de temperatura analizadas en este trabajo la capacidad del estigma para soportar la adhesión, la germinación de polen y el crecimiento inicial del tubo polínico se extiende al momento de la apertura de la flor como funcionalmente masculina, aunque esta capacidad se ve muy mermada justo antes de que la flor en estado masculino cierre definitivamente. Estos efectos son aún más patentes en condiciones de campo, observándose una baja germinación de polen al final de la etapa masculina, probablemente debido a la gran variabilidad de temperatura y humedad relativa observadas durante la etapa de floración. Así, las flores polinizadas durante su segunda apertura permitieron el crecimiento del tubo polínico a lo largo del estilo, aunque no se ha evaluado si tiene lugar la fecundación. No obstante, en la fase femenina la receptividad estigmática no es un factor limitante en la producción en este frutal y en este trabajo la viabilidad de óvulos registrada bajo las condiciones analizadas fue suficiente para asegurar un buen nivel de fecundación.

El hecho de que el estigma de las flores que abren en estado masculino sea capaz de permitir la germinación de polen y el crecimiento inicial del tubo polínico, principalmente bajo las condiciones de humedad relativa del 75% y temperatura entre 20 y 25°C, es de gran interés puesto que la polinización en el estado masculino podría considerarse como un mecanismo encaminado a asegurar la fecundación en aquellas condiciones en las que la fecundación cruzada se vea dificultada. Trabajos realizados en Florida, en condiciones climáticas subtropicales húmedas, muestran que la mayor parte de polen se deposita sobre el estigma de la misma flor durante su segunda apertura, es decir cuando la flor es funcionalmente masculina (Davenport, 1989), convirtiéndose la autofecundación en un mecanismo que asegura la producción. Además en este trabajo se ha puesto de manifiesto que el porcentaje de germinación del polen



colectado de las anteras interiores es superior al de las exteriores y, cuando la flor abre en estado masculino, las anteras interiores se encuentran muy próximas al estigma de la flor, con lo que la autofecundación podría producirse en algunos casos incluso en ausencia de insectos polinizadores y, de esta forma, podría explicarse la gran proporción de frutos autofecundados obtenido bajo nuestras condiciones de cultivo. De este modo, la autopolinización podría ocurrir no sólo por la coexistencia entre flores en estado masculino y femenino de un mismo cultivar sino, además, por la polinización en el estadio masculino de la flor.

La extensión de la duración de la etapa de floración, la producción exuberante de flores y la extensión del periodo de receptividad estigmática se consideran mecanismos de adaptación frente a condiciones desfavorables (Beardsell et al., 1993) y principalmente en aquellos ambientes donde la actividad del polinizador es reducida (Herrera, 1982) incrementándose de esta forma la oportunidad de polinización. Desde un punto de vista agronómico, la duración de la receptividad es de gran interés puesto que aumenta las oportunidades de fecundación (Nepi y Pacini, 1993; Tangmitcharoen y Owens, 1997; Sornsathepornkul y Owens, 1998; Aleemullah et al., 2000) y condiciona el número de polinizadores efectivos que puedan visitar la flor. Evidentemente, en aquellos casos en los que la polinización durante la etapa femenina no sea limitante, estos granos de polen presentarán ventajas con respecto a los que se depositen durante el estado masculino.

### **Las reservas nutritivas de la flor juegan un importante papel determinando el destino de la flor**

Debido a que en aguacate sólo una pequeña fracción de las flores producidas es capaz de transformarse en fruto y que ni la deficiencia de polinización ni la fase progámica pueden explicar por sí solas las bajas tasas de cuajado obtenidas en este frutal, se evaluó la importancia de las reservas nutritivas de la flor en su éxito reproductivo. El término calidad de flor se utiliza



para expresar cualidades inherentes a la flor que tienen consecuencias en el cuajado.

El almidón juega un importante papel en el éxito reproductivo (Herrero, 1992; Herrero y Hormaza, 1996). Desde la polinización a la fecundación, el almidón acumulado en el pistilo es empleado como una fuente nutritiva en diferentes momentos. En el estilo, el crecimiento del tubo es heterótrofo, a partir de las reservas previamente acumuladas en el tejido transmisor del estilo (Herrero y Dickinson, 1979) y el almidón acumulado en el ovario está implicado en el destino del óvulo (Rodrigo y Herrero, 1998; Willensen y Franssen-Verheijen, 1983; Wilms, 1980; Sornsathapornkul y Owens, 1999).

En este trabajo se ha puesto de manifiesto que las reservas de almidón en el pistilo en el momento de antesis juegan un papel importante en el cuajado. Así, estos resultados corroboran los obtenidos en trabajos anteriores con otras especies en los que se han descrito diferencias en cuanto al contenido de almidón en el óvulo de las flores entre cultivares que muestran diferentes tasas de abscisión de flores, presentando mayor contenido de almidón las flores de los cultivares con menor tasa de caída de flores (Lebon et al., 2004) e incluso entre flores del mismo genotipo (Rodrigo et al., 2000). En este trabajo se ha observado que poblaciones de flores con distinta capacidad de cuajado presentan diferentes niveles de almidón en el ovario en el momento de antesis. En el año de alta producción se observó la existencia de una población de flores que abren al final del mes de mayo, y rara vez cuajan, puesto que estos frutos muestran una serie de desventajas con respecto a los frutos de formación más tempranos (Lee, 1998). Para ir un paso más allá en la importancia de las reservas en el cuajado, tras observar la existencia de correlación entre el contenido de almidón en el estilo y en el ovario, el método consistente en cortar los estilos tras el paso de los tubos polínicos hacia el ovario (Rodrigo et al., en prensa) permitió relacionar el destino del ovario que permanece en el árbol con su contenido de almidón en el momento de antesis. Así, el contenido de almidón en el momento de antesis fue significativamente superior en aquellas flores que se transformaron en frutos y



que permanecieron en el árbol hasta el momento de la madurez que el contenido de aquellas que fueron cayendo. De este modo, el contenido de almidón en el ovario de las flores juega un importante papel como condicionante del cuajado, siendo una condición necesaria pero no suficiente para que una flor se desarrolle en fruto.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que en el momento del desarrollo inicial de los frutos, éstos compiten entre ellos por las reservas al igual que con el crecimiento vegetativo que ocurre durante la etapa de floración siendo estos brotes un sumidero de energía (Whiley, 1990) lo que podría explicar una caída prematura de frutos en desarrollo por la competencia de éstos con los brotes vegetativos (Quinlan y Preston, 1971). En aguacate se ha descrito que una reducción en el crecimiento vegetativo que tiene lugar preferentemente durante la semana siguiente a antesis incrementa la producción (Bertling y Köhne, 1986; Köhne y Kremer-Köhne, 1987). Esta intensa competencia entre flores y frutos podría explicar la caída masiva. A partir de la cuarta semana después de la antesis, la caída disminuye considerablemente y este momento coincide con la adquisición de la capacidad fotosintética por parte de los nuevos brotes (Li et al., 1999). De ahí la necesidad de establecer el efecto de la importancia de las reservas de carbohidratos en el cuajado.

### **El aumento de la tasa de fecundación cruzada no significa necesariamente un aumento en la producción**

En las parcelas comerciales, con el objetivo de incrementar la producción, tradicionalmente se han plantado conjuntamente cultivares complementarios en cuanto a su grupo floral debido a la dicogamia protogínica y a la caída selectiva de embriones autofecundados que tiene lugar los meses posteriores a la antesis, de tal forma que incrementando la probabilidad de polinización cruzada aumentaría la producción. Sin embargo, las variedades empleadas como polinizadores generalmente adquieren en el mercado un valor económico muy



inferior al de 'Hass', por lo que la optimización de la necesidad y número de polinizadores tiene importantes consecuencias económicas.

El efecto de la distancia entre cultivares complementarios se ha analizado en distintas zonas productoras, observándose desde la existencia de correlación entre fecundación cruzada producción (Bergh y Garber, 1964; Gustafson y Bergh, 1966; Bergh, 1968; Degani et al., 1989, 1997a), hasta la carencia de correlación entre ambos parámetros (Johannsmeier y Morudu, 1999; Garner et al., 2008). Por lo tanto, los resultados obtenidos en una determinada zona no son necesariamente transferibles a otras regiones con distintas condiciones climáticas y en los que se emplean distintos cultivares y portainjertos.

En este trabajo se ha analizado el efecto de la distancia entre 'Hass' y 'Fuerte' sobre la tasa de alogamia y la producción. Para ello, primeramente se analizaron con marcadores microsatélites los genotipos de aguacate conservados en la E.E. la Mayora para poder evaluar la composición genética de la descendencia. Además de cubrir ese objetivo los resultados obtenidos han permitido optimizar la gestión de germoplasma de aguacate de la E.E. la Mayora y realizar inferencias sobre el origen del material local de aguacate prospectado en España y establecer una primera base de datos con los tamaños alélicos de los diferentes microsatélites en los genotipos más importantes a nivel mundial.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la existencia de una relación significativa entre la distancia al polinizador y la tasa de fecundación cruzada pero no se ha encontrado correlación entre la tasa de fecundación cruzada y la producción, lo que indicaba que, en nuestras condiciones de cultivo el intercalar 'Fuerte' en plantaciones de 'Hass' no aumentaría la producción significativamente. Por otra parte, la tasa de fecundación cruzada muestra variaciones dependiendo del cultivar femenino de estudio, aunque las condiciones de cultivo sean idénticas. Así, en el cultivar Fuerte se encuentran porcentajes de autofecundación superiores a los obtenidos en 'Hass'.

Los altos niveles de autofecundación detectados en el caso de 'Fuerte', bajo nuestras condiciones de cultivo, pueden ser debidos a que éste florece dos



semanas antes que el cultivar Hass, por lo que los primeros frutos que cuajan son resultado de autofecundación y una vez que comienza la floración de ‘Hass’, los frutos resultados de fecundación cruzada deben competir con los ya existentes autofecundados. Además, en ‘Fuerte’ se han observado importantes alteraciones del ciclo floral y un importante solape entre estadios sexuales que favorece el proceso de autopolinización. La etapa de floración de ‘Hass’ solamente se solapa con la de ‘Fuerte’ durante 2-3 semanas, en las que solamente una es de plena floración para ‘Hass’. Por ello, al comienzo de la floración, las flores de ‘Hass’ pueden recibir polen de ‘Fuerte’ obteniéndose frutos resultantes de fecundación cruzada, mientras que al final de la etapa de floración, al no disponer de polen de ‘Fuerte’, los frutos son resultado de autofecundación, viéndose desfavorecidos estos últimos en la competencia por los carbohidratos con respecto a los primeros en formarse. Además, hay que tener en cuenta que las temperaturas más adecuadas tanto para un buen crecimiento de los tubos polínicos como para una buena actividad de los insectos polinizadores (abejas) se producen durante la segunda mitad de la floración de ‘Hass’ cuando ya no existe polen de ‘Fuerte’. Por ello, sería de interés realizar experimentos adicionales sobre la producción de ‘Hass’ utilizando polinizadores alternativos a ‘Fuerte’ que muestren un solape con ‘Hass’ especialmente durante la segunda mitad de su floración.

### **La caída de frutos no ocurre de forma selectiva**

En aguacate, frecuentemente la baja producción se ha asociado a una caída masiva de frutos procedentes de autofecundación (Degani et al., 1984; 1986) sugiriendo que el genotipo del embrión juega un importante papel en la retención de los frutos por el árbol (Degani et al., 1989; 1997a).

En este trabajo no se han obtenido evidencias de que se produzca un aborto selectivo de frutos ni una retención preferente de frutos procedentes de cruzamientos con ‘Fuerte’ con respecto a aquellos autofecundados de ‘Hass’. Si bien es cierto que un alto porcentaje de los frutos que caen el mes siguiente al final de la floración proceden de autofecundación, la caída que se observa



durante el mes de julio también presenta un alto porcentaje de frutos procedentes de cruzamientos. Los datos sugieren que la mayor parte de los frutos que caen durante los meses de junio y julio son frutos que probablemente se corresponden con las flores polinizadas durante las últimas semanas de la etapa de floración de 'Hass', procediendo la mayor parte de los frutos de autofecundación, puesto que 'Fuerte' presenta muy pocas o ninguna flor durante aproximadamente las dos últimas semanas de la floración de 'Hass'. Estos frutos de pequeño tamaño formados preferentemente al final de la etapa de floración, independientemente de su genotipo, van a presentar una serie de desventajas frente a los frutos de mayor tamaño a la hora de competir por las reservas nutritivas, competencia que se ve intensificada por el crecimiento vegetativo que tiene lugar durante la primavera. Es decir, que la caída de flores y frutos dependería fundamentalmente del momento de la fecundación más que del parental masculino.

Esta autofecundación puede deberse al solape entre estadios sexuales ocasionado en gran parte por las condiciones climáticas existentes y, además, podría tener lugar mediante polinizaciones durante el estadio masculino. Por ello, y debido a que no existe una correlación clara entre fecundación cruzada y producción, aquellas condiciones ambientales que favorezcan la autopolinización podrían contribuir significativamente a un aumento en la producción.

En cualquier caso, los resultados obtenidos con 'Fuerte' no son necesariamente extrapolables a otras variedades polinizadores. De hecho, se han observado diferencias en el cuajado al emplear polinizadores como 'Nobel' y 'Marvel' en comparación con 'Fuerte' ya que porcentaje de cuajado obtenidos con polen de estos genotipos fue muy superior al obtenido con 'Fuerte'. 'Nobel' y 'Marvel' se eligieron para este ensayo por presentar frutos similares a 'Hass' y porque sus etapas de floración presentaron suficiente solape con la de 'Hass'. Todos estos datos sugieren que 'Marvel' y 'Nobel' pueden ser polinizadores de interés para nuestras condiciones de cultivo aunque se necesitan ensayos en campo similares a los realizados con 'Fuerte' en este trabajo antes de llegar a conclusiones y recomendaciones definitivas.



En definitiva, los resultados obtenidos en este trabajo nos llevan a concluir que es posible aumentar la producción de aguacate en nuestras condiciones de cultivo gracias al conocimiento de algunos cuellos de botella durante la fase reproductiva. Así la existencia de un alto grado de solape entre flores de ‘Hass’ y la posibilidad de autopolinización dentro de flores en estado masculino, indican que un aumento en la densidad de insectos polinizadores puede ser un factor de importancia, tanto en años de alta como de baja producción. Además la búsqueda de polinizadores alternativos puede ayudar a aumentar la producción, especialmente durante la segunda mitad de la floración de ‘Hass’. Por otra parte, los resultados obtenidos abren nuevas líneas de investigación en las que profundizar en el futuro, como la importancia de los carbohidratos y otros componentes (como el perseitol) en el éxito reproductivo mediante estudios de expresión genética.



## CONCLUSIONES

1. La puesta a punto de un método adecuado de germinación de polen de aguacate *in vitro* ha permitido observar que el efecto de la temperatura sobre la germinación *in vitro* de polen es variable en función de la raza botánica. El incremento de la temperatura afecta a los genotipos de raza antillana incrementando el porcentaje de germinación mientras que aquellos de raza Guatemalteca, Mejicana e híbridos entre ambas razas no presentan variaciones en su germinación a temperaturas comprendidas entre 20 y 30°C.
2. El aguacate muestra una fase progámica rápida. Esta fase se ve afectada por las condiciones ambientales, de tal forma que las altas temperaturas aceleran el crecimiento del tubo polínico, mientras que las bajas temperaturas aumentan el tiempo necesario para que tenga lugar la fecundación.
3. Bajo condiciones de 20-25°C de temperatura y de alta humedad relativa, el estigma conserva la capacidad de permitir la germinación y posterior crecimiento del tubo polínico cuando la flor abre en estado masculino, favoreciendo la autopolinización.
4. Las diferencias de cosecha entre los años de alta y baja producción, radica en la intensidad de la floración, no existiendo diferencias en las tasas de cuajado entre ambos años.
5. El estado nutritivo del pistilo está relacionado con el éxito reproductivo de la flor, puesto que se han observado diferencias en el contenido de almidón en el momento de anthesis. El contenido de almidón es mayor en aquellas flores que son retenidas en el árbol hasta el momento en el que alcanzan la madurez que en aquellas que caen. El estado nutritivo de la flor se convierte en una condición necesaria aunque no suficiente para el cuajado.



**6.** Los resultados obtenidos tras la identificación varietal, indican que los SSRs son unos excelentes marcadores para optimizar el manejo del germoplasma de aguacate permitiendo la identificación inequívoca de todos los cultivares excepto de un grupo de cultivares que resultaron indistinguibles morfológicamente, lo que apunta a que son mutaciones puntuales del cultivar Hass. Además, resultan ideales para análisis de paternidad.

**7.** La distancia entre los cultivares complementarios ‘Hass’ y ‘Fuerte’ tiene un efecto en la tasa de fecundación cruzada; sin embargo, no se encuentran diferencias en producción al variar la distancia.

**8.** El genotipo del embrión no parece determinante en la caída de frutos en desarrollo que tiene lugar durante los meses posteriores a la antesis, sino que caen preferentemente aquellos frutos que se forman al final de la etapa de floración de ‘Hass’. Estos frutos proceden en gran medida de autofecundación, puesto que durante las últimas semanas de la etapa de floración de ‘Hass’, ‘Fuerte’ no presenta flores.

**9.** Teniendo en cuenta la duración de la etapa de floración, el solape entre estados sexuales y el cuajado, los cultivares Marvel (BL516) y Nobel (BL667) podrían ser interesantes como polinizadores para ‘Hass’ en nuestras condiciones de cultivo.

**BIBLIOGRAFÍA**

- AFIK, O., A. DAG, Z. KEREM, S. SHAFIR (2006) Analyses of avocado (*Persea americana*) nectar properties and their perception by honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology* 32: 1949-1963.
- ALBURQUERQUE, N., L. BURGOS, J. EGEA (2002) Variability in the developmental stage of apricot ovules at anthesis and its relationship with fruit set. *Annals of Applied Biology* 141 (2): 147-152.
- ALCARAZ M.L., J.I. HORMAZA (2007) Molecular characterization and genetic diversity in an avocado collection of cultivars and local Spanish genotypes using SSRs. *Hereditas* 144: 244-253.
- ALCARAZ M.L., J.I. HORMAZA (2009) Selection of potential pollinizers for 'Hass' avocado based on flowering time and male-female overlapping. *Scientia Horticulturae* (en prensa).
- ALEEMULLAH, M., A.M. HAIGH, P. HOLFORD (2000) Anthesis, anther dehiscence, pistil receptivity and fruit development in the Longum group of *Capsicum annuum*. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 40: 755-762.
- ALONI B., T. PASHKAR, L. KARNI (1991) Partitioning of (C-14) sucrose and acid invertase activity in reproductive-organs of pepper plants in relation to their abscission under heat-stress. *Annals of Botany* 67: 371-377.
- ALONI, B., L. KARNI, Z. ZAIDMAN, A.A. SCHAFFER (1996) Changes of carbohydrates in pepper (*Capsicum annuum* L) flowers in relation to their abscission under different shading regimes. *Annals of Botany* 78: 163-168.
- ANEJA, M., T. GIANFAGNA, E. NG, I. BADILLA (1992) Carbon dioxide and temperature influence pollen germination and fruit set in cocoa. *HortScience* 27:1038-1040.
- ANVARI, S.F., R. STÖSSER (1978) Eine neue fluoreszenz-mikroskopische Methode zur beurteilung der befruchtungsfähigkeit der samenanlagen bei Prunus. *Z. Pflanzenzüch.* 81: 333-336.
- ARBELOA, A., M. HERRERO (1987) The significance of obturator in the control of pollen tube entry in the ovary in peach (*Prunus persica*). *Annals of Botany* 60: 681-685.
- ARBELOA, A., M. HERRERO (1991) Development of the ovular structures in peach [*Prunus-persica* (L) Batsch]. *New Phytologist* 118: 527-533.
- ARPAIA, M.L., D. STOTTLEMYER, L.M. BATES, E. FOCHT (2005) The California cross pollination experiment- a progress report on the influence of pollinizer variety and proximity of 'Hass' yield. *New Zealand and Australia Avocado Grower's Conference '05*. Tauranga, New Zealand. Session 7. Flowering, fruit set and yield. 9 pages.



- ASHWORTH, V.E.T.M., M.T. CLEGG (2003) Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): Genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. *Journal of Heredity* 94: 407-415.
- ASHWORTH, E.N., V.E. STIRM, J.J. VOLENEC (1993) Seasonal variations in soluble sugars and starch within woody stems of *Cornus sericea* L., *Tree Physiology* 13: 379–388.
- ASHWORTH, V.E.T.M., M.C. KOBAYASHI, M. DE LA CRUZ, M.T CLEGG (2004) Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): development of dinucleotide and trinucleotide markers. *Scientia Horticulturae* 101: 255-267.
- AUSTIN, P.T., E.W. HEWETT, D. NOITON, J.A. PLUMMER (1998) Self-incompatibility and temperature affect pollen tube growth in ‘Sundrop’ apricot (*Prunus armerica* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 73 (3): 375–386.
- AYSEL, S. (2008) Seasonal changes of total carbohydrate contents in three varieties of apple (*Malus sylvestris* Miller) stem cuttings. *Scientia Horticulturae* 109: 234-237.
- BEARDSSELL D.V., R.B. KNOX, E.G. WILLIAMS (1993) Breeding system and reproductive success of *Thryptomene calycina* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* 41: 333-353.
- BEKEY, R. (1989) To be or not to be-pollination of avocados. *California Growers* 13 (2): 30-32.
- BENNETT J., M.C.T. TROUGHT, P. JARVIS (2002) The importance of overwintering carbohydrates on inflorescence development and yield potential. *The Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker* 456: 70-72.
- BEN-YA'ACOV, A., M. ZILBERSTAIN, M. GOREN, E. TOMER (2003) The Israeli avocado germplasm bank: where and why the items had been collected. *Proceedings V World Avocado Congress*, pp.13-19.
- BERGH, B.O. (1966) A Hass open-pollinated progeny set. *California Avocado Society Yearbook* 50: 64-78.
- BERGH, B.O. (1968) Cross-pollination increases avocado set. *Cirtograph* 53: 97-100.
- BERGH, B.O. (1969) Avocado (*Persea americana* Miller). In: Ferwerda, F.P. and Wit, F (eds). *Outlines of Perennial Crop Breeding in the Tropics*. Landbouwhogeschool, Wageningen, The Netherlands, pp. 23-51.
- BERGH, B.O. (1974) The remarkable avocado flower. *California Avocado Society Yearbook* 57: 40-41.



- BERGH, B.O. (1977) Factors affecting avocado fruitfulness. In: Sauls, J.W., R.L. and Jackson, L.K. (eds). Proceeding of the First International Fruits Short Course: the Avocado. University of Florida, Gainesville, Florida, pp. 83-88.
- BERGH, B.O. (1986) *Persea americana*. In: Halevy, A.H. (ed) Handbook of Flowering, Vol. V. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 253-268.
- BERGH, B.O. (1995) Avocado. In: Smartt, J., Simmonds N.W. (Eds.), Evolution of Crop Plants. Longman Scientific & Technical, Harlow, UK. pp. 240-245.
- BERGH, B.O., M.J. GARBER (1964) Avocado yields increased by interplanting different varieties. California Avocado Society Yearbook 48:78-85.
- BERGH, B.O., C.D. GUSTAFSON (1958) Fuerte fruit set as influenced by cross-pollination. California Avocado Society Yearbook 42: 64-66.
- BERGH, B.O., C.D. GUSTAFSON (1966) The effect of adjacent trees of other avocado varieties on 'Fuerte' fruit set. Proceeding of the American Society for Horticultural Science 89: 167-174.
- BERGH, B.O., E. LAHAV (1996) Avocados. In: Janick, J., Moore, J.N. (Eds.), Fruit Breeding, Vol. 1: Tree and Tropical Fruits, pp. 113-166. John Wiley and Sons, New York.
- BERTLING I., J.P. BOWER (2006) Avocado sugars during early fruit development. South African Avocado Growers' Association Yearbook 29: 38-39.
- BERTLING, I., S. KÖHNE (1986) Investigation into fruitset of avocado. South African Avocado Grower's Association Yearbook 9: 59-60.
- BIRKHEAD, T.R., A.P. MOLLER (1998) Sperm competition and sexual selection. London: Academic Press.
- BLANKE, M.M., C.J. LOVATT (1996) Determinate versus indeterminate inflorescences of the 'Hass' avocado. Avocado Research Symposium California Avocado Society and University of California, Riverside. pp. 39-43
- BLUMENFELD, A., S. GAZIT, E. ARGAMAN (1983) Factors involved in avocado productivity. Spec Publ no 222, 84-85, Volcani Center, Israel.
- BORRONE, W.J., R.J. SCHNELL, H.A. VIOLY, R.C. PLOETZ (2007) Seventy microsatellite markers from *Persea americana* Miller (avocado) expressed sequences tags. Molecular Ecology Notes 7: 439-444.
- BORRONE, J.W., C.T. TONDO, D.N. KUHN, J.S. BROWN, R.J. SCHNELL, H.A. VIOLI (2008) Out-crossing in Florida avocados as measured using microsatellite markers. Journal of the American Society for Horticultural Science 133(2): 255-261.
- BREWBAKER, J.L. (1967) Distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in Angiosperms. American Journal of Botany 54: 1069-1083.



- BREWBAKER, J.L., B.H. KWACK (1963) Essential role of the calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany* 50: 747-858.
- BREWBAKER, J.L., S.K. MAJUMDER (1961) Cultural studies of the pollen population effect and the self-incompatibility inhibition. *American Journal of Botany* 74: 457-464.
- BRINGHURST, R.S. (1952) Sexual reproduction in the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 37: 210-214.
- BROWN, A.H.D., R.W. ALLARD (1970) Estimation of the mating system in open-pollinated maize populations using isozyme polymorphisms. *Genetics* 66: 133-145.
- BRUN, W.A., K.J. BETTS (1984) Source/sink relations of abscising and nonabscising soybean flowers. *Plant Physiology* 75: 187-191.
- BRUNET, J. (1996) Male reproductive success and variation in fruit and seed set in *Aquilegia caerulea* (Ranunculaceae). *Ecology* 77: 2458-2471.
- BUCHHOLZ, A. (1986) Carbohydrate partitioning between fruitlets and young vegetative growth as a possible factor involved with fruitlet abscission in avocado. M.Sc. thesis, Hebrew University of Jerusalem.
- BUFLER, G., A. BEN YA'ACOV (1992) A study of avocado germplasm resources, 1988-1990. *Proceedings Second World Avocado Congress (Orange California)* 2: 545-550.
- BUITINK, J., C. WALTERS, F. HOEKSTRAAND, J. CRANE (1998) Storage behaviour of *Typha latifolia* pollen at low water contents: an interpretation on the basis of water activity and glass concepts. *Plant Physiology* 103: 145-153.
- BURGOS, L., J. EGEA (1993) Apricot embryo sac development in relation to fruit set. *Journal of Horticultural Science* 69: 203-208.
- BURGOS, L., J. EGEA, F. DICENTA (1991) Effective pollination period in apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. *Annals of Applied Biology* 119: 533-539.
- BUZGO, M., A.S. CHANDERBALI, S. KIM, Z. ZHENG, D.G. OPPENHEIMER, P.S. SOLTIS, D.E SOLTIS (2007) Floral development morphology of *Persea americana* (avocado, Lauraceae): the oddities of male organ identity. *International Journal of Plant Sciences* 168(3): 261-284.
- CALABRESE, F. (1992) *El aguacate*. Palermo. Ediciones MundiPrensa. 249 pp.
- CALZONI, G.L., A. SPERANZA, N. BAGNI (1979) In vitro germination of apple pollens. *Scientia Horticulturae* 10: 49-55.
- CAMERON, S.H., R.T. MUELLER, A. WALLACE (1952) Nutrient composition and seasonal losses of avocado trees. *California Avocado Society Yearbook* 37: 201-209.



- CAMPOS-ROJAS, E., T. TERRAZAS, L. LÓPEZ-MATA (2007) *Persea* (avocados) phylogenetic analysis based on morphological characters: hypothesis of species relationships. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 249–258.
- CEROVIC, R., D. RUZIC (1992) Senescence of ovules at different temperatures and their effect on the behaviour of pollen tubes in sour cherry. *Scientia Horticulturae* 51: 321-327.
- CEROVIC, R., D. RUZIC, N. MICIC (2000) Viability of plum ovules at different temperatures. *Annals of Applied Biology* 137: 53-59.
- CHANDERBALI, A.S., H. VAN DER WERFF, S.S. RENNER (2001) Phylogeny and historical biogeography of Lauraceae: evidence from chloroplast and nuclear genomes. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88: 104-134.
- CHANDERBALI, A.S., V.A. ALBERT, V.E.T.M. ASHWORTH, M.T. CLEGG, R.E. LITZ, D.E. SOLTIS, P.S. SOLTIS (2008) *Persea americana* (avocado): bringing ancient flowers to fruit in the genomics era. *Bioessays* 30: 386-396.
- CHANDLER, W. (1962) *Frutales de hoja perenne*. Mexico- D.F., Mexico, Editorial Hispanoamericana. 666 pp.
- CHAPIN, F.S.I., E.D. SCHULZE, H.A. MOONEY (1990) The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 423-447.
- CHARLESWORTH, D. (1989) Why do plants produce so many ovules than seeds?. *Nature* 338: 21-22.
- CHEN, H., V.E.T.M. ASHWORTH, S. XU, M.T. CLEGG (2007) Quantitative genetic analysis of growth rate in avocado. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 132: 691–696.
- CHEN, H., P.L. MORRELL, V.E.T.M. ASHWORTH, M. DE LA CRUZ, M.T. CLEGG (2009) Tracing the geographic origins of major avocado cultivars. *Journal of Heredity* 100: 56-65.
- CHEUNG, A.Y., H.M. WU (2001) Pollen tube guidance – right on target. *Science* 293: 1441–1442.
- CLEGG, M T. (1980) Measuring plant mating systems: *BioScience* 30: 814–818.
- CLEMENT, C., M. BURRUS, J.C. AUDRAN (1996) Floral organ growth and carbohydrate content during pollen development in *Lilium*. *American Journal of Botany* 83: 459-469.
- COETZER, L.A., P.J. ROBBERTSE (1987) Pollination biology of *Persea americana* Fuerte. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 10: 43-45.
- COLE, R.A., L. SYNEK, V. ZARSKY, J.E. FOWLER (2005) SEC8, a subunit of the putative Arabidopsis exocyst complex, facilitates pollen germination and competitive pollen tube growth. *Plant Physiology* 138: 2005–2018.



## Bibliografía

- CUEVAS, J., L. RALLO, H.F. RAPOPORT (1994) Initial fruit set a high temperature in olive, *Olea europaea* L. *Journal of Horticultural Science* 69: 665-672.
- DAFNI, A., M.M. MAUES (1998) A rapid and simple procedure to determine stigma receptivity. *Sexual Plant Reproduction* 11: 177-180.
- DAVENPORT, T.L. (1982) Avocado growth and development. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 95: 92-96.
- DAVENPORT, T.L. (1986) Avocado flowering. *Horticultural Reviews* 8: 257-289.
- DAVENPORT, T.L. (1989) Pollen deposition on avocado stigma in Southern Florida. *HortScience* 24: 844-845.
- DAVENPORT, T.L. (1991) A new look at avocado pollination. *Tropical Fruit World* 2: 3-4.
- DAVENPORT, T.L. (1999) A view from Florida on avocado pollination. In: M. L. Arpaia and R. Hofshi (eds.), *Proceedings of Avocado Brainstorming. Session 5. Pollination.* pp 101-104. October 27-28, 1999. Riverside, CA. Hofshi Foundation.
- DAVENPORT, T.L. (2003) Evidence for wind-mediated, self and cross pollination of 'Hass' avocado trees growing in mediterranean environments. *Proceedings V World Avocado Congress* pp. 221-226.
- DAVENPORT, T.L., E. LAHAV (1992) Is a pollinator required to maximize avocado production, p.169-172. In: C.J. Lovatt (ed). *Proceedings Second World Avocado Congress*, Orange, California.
- DAVENPORT, T.L., M. MANNERS (1983) Nucellar senescence and ethylene production as they relate to avocado fruitlet abscission. *Journal of Experimental Botany* 33: 815-825.
- DAVENPORT, T.L., P. PARNITZKI, S. FRICKE, M.S. HUGHES (1994) Evidence and significance of self-pollination of avocado in Florida. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 119(6): 1200-1207.
- DAVENPORT, T.L., Z. YING, R.J. SCHNELL (2006) Use of simple sequence repeats (SSR) to determine incidence and effectiveness of self and cross pollinated avocado fruit in southern California, year 3 of 3. *Proceedings California Avocado Research symposium University of California. Riverside.* 4 Nov 2006 pp 64-80.
- DAVIE, S.J., P.J.C. STASSEN, M. VAN DER WALT, B. SNIJDER (1995) Girdling avocado trees for improved production. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 18: 51-53.
- DAVIS, J., D. HENDERSON, M. KOBAYASHI, M.T. CLEGG (1998) Genealogical relationships among cultivated avocado as revealed through RFLP analysis. *Journal of Heredity* 89: 319-323.



- DEGANI, C., S. GAZIT (1984) Selfed and Crossed proportions of avocado progenies produced by caged pairs of complementary cultivars. *HortScience* 19(2): 258-260.
- DEGANI, C., A. GOLDRING, S. GAZIT, U. LAVI (1986) Genetic selection during the abscission of avocado fruitlets. *HortScience* 21: 1187-1188.
- DEGANI, C., A. GOLDRING, S. GAZIT, U. LAVI (1989) Pollen parent effect on outcrossing rate in 'Hass' and 'Fuerte' avocado plots during fruit development. *Journal of American Society for Horticultural Science* 114: 106-111.
- DEGANI, C., A. GOLDRING, I. ADATO, R. EL-BATRI, S. GAZIT (1990) Pollen parent effect on outcrossing rate, yield and fruit characteristics of 'Fuerte' avocado. *HortScience* 25: 471-473.
- DEGANI, C., R. EL-BATSRI, S. GAZIT (1994) Isozyme analysis of subtropical tree. *Polis Journal of Chemistry* 68: 1031-1034.
- DEGANI, C., R.A. STERN, R. EL-BATSRI, S. GAZIT (1995) Pollen parent effect on the selective abscission of 'Mauritius' and 'Floridian' lychee fruitlets. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120: 523-526.
- DEGANI, C., R. EL-BATSRI, S. GAZIT (1997a) Outcrossing rate, yield and selective fruit abscission in 'Ettinger' and 'Ardith' avocado plots. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122: 813-817.
- DEGANI, C., O. YUTKO, R. EL-BATSRI, S. GAZIT (1997b) Outcrossing rate in adjacent 'Maya' and 'Tommy Atkins' mango block. *Scientia Horticulturae* 70: 25-30.
- DEGANI, C., E. LAHAV, R. EL-BATSRI (2003) Caging single avocado trees beehive does not guarantee exclusive formation of selfed progeny. *HortScience* 38(7): 1433-1434.
- DE GRAAF, B.H.J., J.W.M. DERKSEN, C. MARIANI (2001) Pollen and pistil in the progamic phase. *Sexual Plant Reproduction* 14: 41-55.
- DE LA ROSA, R., L. RALLO, H.F. RAPOPORT (2000). Olive floral bud growth and starch content during winter rest and spring budbreak. *HortScience* 35 (7): 1223-1227.
- DELPH, L.F., M.H. JOHANNSSON, A.G. STEPHENSON (1997) How environmental factors affect pollen performance: ecological and evolutionary perspectives. *Ecology* 78: 1632-1639.
- DIXIT, R., C. RIZZO, M. NASRALLAH, J. NASRALLAH (2001) The Brassica MIP-MOD gene encodes a functional water channel that is expressed in the stigma epidermis. *Plant Molecular Biology* 45: 51-62.
- DREWS, G.N., R. YADEGARI (2002) Development and function of the angiosperm female gametophyte. *Annual Review of Genetics* 36: 99-124.



## Bibliografía

- DUCHÊME E., N. JAEGLI, R. SABLER, J.P. GAUDILLÈRE (2003) Effects of ripening conditions on the following season's growth and yield component for Pinot noir and Gewurztraminer grapevines (*Vitis vinifera* L.) in a controlled environment. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 37: 39-49.
- DUNCAN, D.B. (1955) Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11: 1-42.
- EGEA, J., L. BURGOS (2000) Ovule differences between single-kernelled and double-kernelled fruits in almond (*Prunus dulcis*). *Annals of Applied Biology* 136(3): 291-295.
- EGEA, J., L. BURGOS, J.E. GARCÍA, L. EGEA (1991) Stigma receptivity and style performance in several apricot cultivars. *Journal of Horticultural Science* 66: 19-25.
- EGEA, J., L. BURGOS, N. ZOROA, L. EGEA (1992) Influence of temperature on the in vitro germination of pollen of apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of Horticultural Science* 67: 247-250.
- EGEA, J., F. DICENTA, T. BERENQUER, J.E. GARCÍA (2000) 'Antoñeta' and 'Marta' almonds. *HortScience* 35: 1358-1359.
- EHRLÉN, J. (1991) Why do plants produce surplus flowers? A reserve-ovary model. *American Naturalist* 138: 918-933.
- ELGERSMA, A., A.G. STEPHENSON, A.P.M. DEN NIJS (1989) Effects of genotype and temperature on pollen tube growth in perennials ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Sexual Plant Reproduction* 2: 225-23.
- ELLEMAN, C.J., H.G. DICKINSON (1986) Pollen-stigma interactions in Brassica. IV. Structural reorganisation in the pollen grains during hydration. *Journal of Cell Science* 80: 141-157.
- ELLSTRAND, N.C. (1992) Sex and the single variety. *California Growers* 16(1): 22-23.
- ELLSTRAND, N.C., J.M. LEE, B.O. BERGH, M.D. COFFEY, G.A. ZENTMYER (1986) Isozymes confirm hybrid parentage for 'G755' selections. *California Avocado Society Yearbook* 70: 199-203.
- EXCOFFIER, L., G. LAVAL, S. SCHNEIDER (2005) Arlequin (version. 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. - *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- FAOSTAT (2009) Agriculture data. <http://faostat.fao.org/>. Último acceso abril 2009.
- FARRE, J.M., F. PLIEGO (1987) Avocados in Spain. *South African Avocado Growers Association Yearbook* 10: 27-28.
- FAURE, J.E., C. DIGONNET, C. DUMAS (1994) An in vitro system for adhesion and fusion of maize gametes. *Science* 263: 1598-1600.



- FIEDLER, J., G. BUFLER, F. BANGERTH (1998) Genetic relationships of avocado (*Persea americana* Mill.) using RAPD markers. *Euphytica* 101: 249-255.
- FINAZZO S., T.L. DAVENPORT (1986) Assimilate partitioning in avocado (*Persea americana*). *Plant Physiology* 80: 133.
- FINAZZO, S.F., T.L. DAVENPORT, B. SCHAFFER (1994) Partitioning of photoassimilates in avocado (*Persea americana* Mill.) during flowering and fruit set. *Tree Physiology* 14: 153-164.
- FRANCHI, G.C., M. NEPI, A. DAFNI, E. PACINI (2002) Partially hydrated pollen: taxonomic distribution, ecological and evolutionary significance. *Plant Systematics and Evolution* 234: 211-227.
- FREE, J.B., I.H. WILLIAMS (1976) Insect pollination of *Anacardium occidentale* L., *Mangifera indica* L., *Blighia sapida* Koenig and *Persea americana* Mill. *Tropical Agriculture (Trinidad)* 53: 125-139.
- FRIEDMAN, W.E. (1995) Organismal duplication, inclusive fitness theory, and altruism: understanding the evolution of endosperm and the angiosperm reproductive syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 3913-3917.
- FRIEDMAN, W.E., J.H. WILLIAMS (2004) Developmental evolution of the sexual process in ancient flowering plant lineages. *Plant Cell* 16 Suppl.: 119-132.
- FURNIER, G.R., M.P. CUMMINGS, M.T. CLEGG (1990) Evolution of the avocados as revealed by DNA restriction site variation. *Journal of Heredity* 81: 183-188.
- GAFNI, E. (1984) Effect of extreme temperatures regimes and different pollenizers on the fertilization and fruit-set processes in avocado. MSc Thesis, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel.
- GALEN, C., J.A. SHYKOFF, R.C. PLOWRIGHT (1986) Consequences of stigma receptivity schedules for sexual selection in flowering plants. *American Naturalist* 127: 462-476.
- GALINDO-TOVAR, M.E., N. OGATA-AGUILAR, A.M. ARZATE-FERNANDEZ (2008) Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 441-450.
- GARCÍA, J. (2003) Situación del cultivo de aguacate en España. Congreso Mundial del Aguacate. Resumen A-206: 004-007.
- GARCÍA-LUIS A., F. FORNÉS, A. SANZ, J.L. GUARDIOLA (1988) The regulation of flowering and fruit set in Citrus: relationship with carbohydrate levels. *Israel Journal of Botany* 37: 189-201.
- GARDIAZABAL, F., G. ROSENBERG (1991) El Cultivo del Palto. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. Quillota, Chile, 201 pp.



## Bibliografía

- GARNER, L.C., C.J. LOVATT (2008) The relationship between flower and fruit abscission and alternate bearing of 'Hass' avocado. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133: 3-164.
- GARNER, L.C., V.E.T.M. ASHWORTH, M.T. CLEGG, C.J. LOVATT (2008) The impact of outcrossing on yields of 'Hass' avocado. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133: 631-722.
- GAWEL, N.J., C.D. ROBACKER (1983) Effect of pollen-style interaction on the pollen tube growth of *Gossypium hirsutum*. *Theoretical and Applied Genetics* 72: 84-87.
- GAZIT, S. (1977) Pollination and fruit set of avocados. In: Sauls, J.W., R.L. and Jackson, L.K. (eds). *Proceedings of the First International Fruits Short Course: the Avocado*. University of Florida, Gainesville, Florida, pp. 88-92.
- GAZIT S., C. DEGANI (2002) Reproductive Biology: In: Wiley T., Schafer B, Wolstenholme BN (eds). *The Avocado: Botany, Production and Uses*. CABI Publishing, Wallingford Oxen, UK pp. 101-133.
- GILLESPIE, J.H., M. TURELLI (1989) Genotype-environment interactions and the maintenance of polygenic variation. *Genetics* 121: 139-138.
- GOLDRING, A., D. ZAMIR, C. DEGANI (1985) Duplicated phosphoglucose isomerase genes in avocado. *Theoretical and Applied Genetics* 71: 491-494.
- GOLDRING, A., S. GAZIT, C. DEGANI (1987) Isozyme analysis of mature avocado embryos to determine outcrossing rate in a 'Hass' plot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 112: 380-392.
- GOLDSCHMIDT, E.E., S.P. MONSELINE (1977) Physiological assumptions toward the development of a Citrus fruiting model. *Proceedings of the International Society of Citriculture* 2: 668-672.
- GOLDSCHMIDT, E.E., N. ASCHKENAZI, Y. HERZANO, A.A. SCHAFFER, S.P. MONSELISE (1985) A role for carbohydrate levels in the control of flowering in citrus. *Scientia Horticulturae* 26: 159-166.
- GOLDWIN, G.K. (1981) Hormone-induced setting of Cox apple. *Malus pumilla*, as affected by time of application and flower type. *Journal of Horticultural Science* 56: 345-352.
- GÓMEZ-CADENAS, A., J. MEHOUACHI, F.R. TADEO, E. PRIMO-MILLO, M. TALÓN (2000) Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in Citrus. *Planta* 210: 636-643.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, J.J., F. DE LA PEÑA, J.I. HORMAZA, J.R. BOYERO, J.M. VELA, E. WONG, M.M. TRIGO, M. MONTSERRAT (2008) Alternative food improves the combined effect of an omnivore and a predator on biological pest control. A case study in avocado orchards. *Bulletin of Entomology Research* 8: 1-12.



- GREEN J.R. (1894) On the germination of pollen grain and the nutrition of the pollen tube. *Annals of Botany* 8: 225–228.
- GRIGGS, W.H., A.L. SCHRADER (1941) Effect of branch ringing before and after blossoming on the fruit set of the Delicious apple. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* 38: 89-90.
- GRIGGS, W.H., B.T. IWAKIRI (1975) Pollen tube growth in almond flowers. *California Agriculture* 29 (1): 4-7.
- GUARDIOLA, J.L. (1988) Factors limiting productivity in Citrus. A physiological approach. *Proceedings of the International Society of Citriculture* 2: 381-394.
- GUERRERO-PRIETO, V.M., M.D. VASILAKAKIS, P.B. LOMBARD (1985) Factors controlling fruit set of ‘Napoleon’ sweet sherry in Western Oregon. *Hortscience* 20: 913-914.
- GUIL, I., S. GAZIT (1992) Pollination of the Hass avocado cultivar. *World Avocado Congress II Proceedings*. Orange, California, April 21-26, 241 pp.
- GUINN, G. (1974) Abscission of cotton floral buds and bolls as influenced by factors affecting photosynthesis and respiration. *Crop Science* 14: 291–293.
- GUITIÁN, J. (1993) Why *Prunus mahaleb* (Rosaceae) produces more flowers than fruits? *American Journal of Botany*: 80: 1305–1309.
- GUITIÁN, J. (1994) Selective fruit abortion in *Prunus mahaleb* (Rosaceae). *American Journal of Botany* 81 (12): 1555-1558.
- GUSTAFSON, C.D. (1967) The cost to produce avocados in San Diego country. *California Avocado Society yearbook* 51: 67-69.
- GUSTAFSON, C.D, B.O. BERGH (1966) Interplanting complementary avocado varieties aids fruit production. *California Avocado Society yearbook* 50: 50-51.
- HALDANE, J.B.S. (1932) *The Causes of the Evolution*. Harper, London.
- HASHIDA, S.N., H. TAKAHASHI, M. KAWAI-YAMADA, H. UCHIMIYA (2007) *Arabidopsis thaliana* nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (AtNMNAT) is required for pollen tube growth. *Plant Journal* 49: 694–703.
- HEDHLY, A., J.I. HORMAZA, M. HERRERO (2003) The effect of temperature on stigmatic receptivity in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Cell and Environment* 26: 1673-1680.
- HEDHLY, A., J.I. HORMAZA, M. HERRERO (2004) Effect of temperature on pollen tube kinetics and dynamics in sweet cherry, *Prunus avium* (Rosaceae). *American Journal of Botany* 91: 558-564.
- HEDHLY, A., J.I. HORMAZA, M. HERRERO (2005) Influence of genotype-temperature interaction on pollen performance. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 1494-1502.



## Bibliografía

- HEDHLY, A., J.I. HORMAZA, M. HERRERO (2007) Warm temperatures at bloom reduce fruit set in sweet cherry. *Journal of Applied of Botany and Food Quality* 81: 158-164.
- HEDHLY, A., J.I. HORMAZA, M. HERRERO (2009) Global warming and sexual plant reproduction. *Trends in Plant Sciences* 14(1): 30-36.
- HEISER, C.B. (1965) Cultivated plants and cultural diffusion in nuclear America. *American Anthropologist* 1: 930–949.
- HERRERA, C.M. (1982) Seasonal variation in quality of fruits and diffuse coevolution between plants and avian dispensers. *Ecology* 63: 773–775.
- HERRERO, M. (1992) From pollination to fertilization in fruit trees. *Plant Growth Regulation* 11: 27-32.
- HERRERO, M. (2000) Changes in the ovary related to pollen tube guidance. *Annals of Botany* 8: 75-89.
- HERRERO, M. (2003) Male-female synchronism and the regulation of mating in flowering plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society, Biological Sciences* 358: 1019-1024.
- HERRERO, M., A. ARBELOA (1989) Influence of the pistil on pollen tube kinetics in peach. *American Journal of Botany* 176: 1441-1447.
- HERRERO, M., H.G. DICKINSON (1979) Pollen-pistil incompatibility in *Petunia hybrida* - changes in the pistil following compatible and incompatible intraspecific crosses. *Journal of Cell Science* 36: 1-18.
- HERRERO, M., H.G. DICKINSON (1980) Ultrastructural and physiological differences between buds and mature flowers of *Petunia hybrida* prior to and following pollination. *Planta* 148: 138-145.
- HERRERO, M., H.G. DICKINSON (1981) Pollen tube development in *Petunia hybrida* following compatible and incompatible intraspecific matings. *Journal of Cell Science* 47: 365-383.
- HERRERO, M., J.I. HORMAZA (1996) Pistil strategies controlling pollen tube growth. *Sexual Plant Reproduction* 9: 343-347.
- HESLOP-HARRISON, J.S. (1979) An interpretation of the hydrodynamics of pollen. *American Journal of Botany* 66: 737-143.
- HESLOP-HARRISON, Y. (2000) Control gates and micro-ecology: the pollen-stigma interaction in perspective. *Annals of Botany* 85, 5-13.
- HESLOP-HARRISON, J., Y. HESLOP-HARRISON (1982) Pollen-stigma interaction in the Leguminosae: constituents of the stylar fluid and stigma secretion in *Trifolium pretense* L. *Annals of Botany* 41: 1233-1258.



- HIGASHIYAMA, T. (2002) The synergid cell: attractor and acceptor of the pollen tube for double fertilization. *Journal of Plant Research* 115: 149-160.
- HIGASHIYAMA, T., S. YABE, N. SASAKI, Y. NISHIMURA, S. MIYAGISHIMA, H. KUROIWA, T. KUROIWA (2001) Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science* 293: 1480-1483.
- HIGASHIYAMA, T., H. KUROIWA, T. KUROIWA (2003) Pollen-tube guidance: beacons from the female gametophyte. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 36-41.
- HISCOCK, S.J., AM. ALLEN (2008) Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus. *New Phytologist* 179: 286 - 317.
- HODGSON, W.H. (1947) Bearing habits of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 32: 35-39.
- HOEKSTRA, F.A., J. BRUINSMA (1980) Control of respiration of binucleate and trinucleate pollen under humid conditions. *Physiologia Plantarum* 48: 71-77.
- HOMSKY, S. (1997) The mango industry in Israel - an overview. *Acta Horticulturae* 455: 7-14.
- HORMAZA, J.I. (2002) Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequences repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 321-328.
- HORMAZA, J.I. (2003) Fertilization success of pollen from 'Fuerte' and 'Bacon' avocados on 'Hass' flowers. *Abstracts of the World Avocado Congress V. A-200* pg. 450-451.
- HORMAZA, J.I., M. HERRERO (1992) Pollen selection. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 663-672.
- HORMAZA, J.I., M. HERRERO (1994) Gametophytic competition and selection. In: *Genetic Control of Self-incompatibility and Reproductive Development in flowering Plants* (E.G. Williams, A.E. Clarke, R.B. Knox, Eds), pp 372-400. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands.
- HORMAZA, J.I., M. HERRERO (1996a) Dynamics of pollen tube growth under different competition regimes. *Sexual Plant Reproduction* 9: 153-160.
- HORMAZA, J.I., M. HERRERO (1996b) Male gametophytic selection as a plant breeding tool. *Scientia Horticulturae* 65: 321-333.
- HORMAZA, J.I., M. HERRERO (1999) Pollen performance as affected by the pistilar genotype in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Protoplasma* 208: 129-135.
- HOUGHTON, J.T., Y. DING, D.J.GRIGGS, M. NOGUER, P.J. VAN DER LINDEN, X. DAI, K. MASKELL, C.A. JOHNSON (2001) IPCC Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I in the Third Assessment



## Bibliografía

- Report of Intergovernmental Panel on Climate Change (Cambridge University Press, Cambridge).
- IGLESIAS, D.J., F.R. TADEO, E. PRIMO-MILLO, M. TALON (2003) Fruit set dependence on carbohydrate availability in citrus trees. *Tree Physiology* 23: 199-204.
- IMBERT, F.M. (1997) Delayed pistil senescence causes an overlap in protogyny in 'Tonnage' avocado. *California Avocado Society Yearbook* 50: 50-51.
- INOUE, H., B. TAKAHASHI (1990) Studies on the bearing behaviour and yield composition of the avocado trees. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 59: 487-501.
- IPGRI. (1995) Descriptors for avocado (*Persea* spp.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- ISH-AM, G. (1994) Interrelationship between avocado flowering and honey bees and its implication on the avocado fruitfulness in Israel. Ph.D. Thesis., Tel Aviv. Israel. pp 157.
- ISH-AM, G., D. EISIKOWITCH (1991) New insight into avocado flowering in relation to its pollination. *California Avocado Society Yearbook* 75:125-137.
- ISH-AM, G., D. EISIKOWITCH (1993) The behaviour of honey bees (*Apis mellifera*) visiting avocado (*Persea americana*) flowers and their contribution to its pollination. *Journal of Apicultural Research* 32: 175-186.
- ISH-AM, G., D. EISIKOWITCH (1998) Mobility of honey bees (*Apidae*, *Apis mellifera* L.) during foraging in avocado orchards. *Apidologie* 29: 209-219.
- ISSARAKRAISILA, M., J.A. CONSIDINE (1994) Effects of temperature on pollen viability in mango cv 'Kensington'. *Annals of Botany* 73: 231-240.
- JACKSON, J.E., P.J.C. HAMER (1980) The causes of year to year variation in the average yield of Cox's Orange Pippin apple in England. *Journal of Horticultural Science* 55: 149-156.
- JEAN, D., L. LAPOINTE (2001) Limited carbohydrate availability as a potential cause of fruit abortion in *Rubus chamaemorus*. *Physiologia Plantarum* 112: 379-387.
- JEFFERIES, C.J., A.R. BELCHER (1974) A fluorescent brightener used for pollen tube identification in vivo. *Stain Technology* 49: 199-202.
- JEFFERIES C.J., P. BRAIN (1984) A mathematical model of pollen-tube penetration in apple styles. *Planta* 160: 52-58.
- JEFFERIES, C.J., P. BRAIN, K.G. STOTT, A.R. BELCHER (1982) Experimental systems and mathematical model for studying temperature effects on pollen-tube growth and fertilization in plum. *Plant Cell and Environment* 5: 231-236.



- JOHANNSMEIER, M.F., T.M. MORUDU (1999) Some factors affecting pollination and yield of Hass avocados. South African Growers' Association Yearbook 22: 22-25.
- JOHANNSMEIER, M.F., D.J. SWART, T.M. MORUDU (1997) Honeybees in an avocado orchard: Forager distribution, influence on fruit set and colony development. South African Avocado Growers' Association Yearbook 20: 39-41.
- JOHANSEN, D.A. (1940) Plant Microtechnique. McGraw-Hill: New York, New York, Estados Unidos.
- JOHNSON, M.A., D. PREUSS (2002) Plotting a course: multiple signals guide pollen tube to their targets. Developmental Cell 2: 273-81.
- JUDO, W.S., C.S. CAMPBELL, E.A. KELLOGG, P.F. STEVENS, M.J. DONOGHUE (2002) Plant systematics: a phylogenetic approach. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
- KADMAN, A., A. BEN-YA'ACOV (1980a) Maoz avocado rootstock selection. HortScience 15: 207.
- KADMAN, A., A. BEN-YA'ACOV (1980b) G.A.-13 avocado rootstock selection. HortScience 15: 206.
- KADMAN, A., A. BEN-YA'ACOV (1981) 'Fuchs-20' avocado rootstock. HortScience 16: 351.
- KAISER, C., B.N. WOLSTENHOLME (1994) Aspects of delayed harvest of 'Hass' avocado (*Persea americana* Mill.) fruit in a cool subtropical climate. II. Fruit size, yield, phenology and whole-tree starch cycling. Journal of Horticultural Science 69: 447-457.
- KAKANI, V.G., K.R. REDDY, S. KOTI, T.P. WALLACE, P. V. V. PRASAD, V. R. REDDY, D. ZHAO (2005) Differences in vitro pollen germination and pollen tube growth of cotton cultivars in response to high temperature. Annals of Botany 96: 56-67.
- KANDIAH, S. (1979) Turnover of carbohydrates in relation to growth in apple trees. I Seasonal variation of growth and carbohydrate reserves. Annals of Botany 44: 175-183.
- KELLY, J.C. (1957) Boron effects on growth, oxygen uptake and sugar absorption by germination pollen. American Journal of Botany 44: 239-244.
- KINET, J.M. (1977) Effect of defoliation and growth-substances on development of inflorescence in tomato. Scientia Horticulturae 6: 27-35.
- KNOX, R.B., J. HESLOP-HARRISON (1970) Pollen-wall proteins: localization and enzymatic activity. Journal Cell Science 6: 1-27.



## Bibliografía

- KOBAYASHI, M., M.T. CLEGG (1996) Outcrossing in avocado: is there a relationship to fruit yield. Avocado Research Symposium pp. 17-21.
- KOBAYASHI, M., J.Z. LIN, J. DAVIS, L. FRANCIS, M.T. CLEGG (2000) Quantitative analysis of avocado outcrossing and yield in California using RAPD markers. *Scientia Horticulturae* 86: 135-149.
- KÖHNE, J.S., S. KREMER-KÖHNE (1987) Vegetative growth and fruit retention in avocado as affected by a new plant growth regulator (Paclobutrazol). *South African Avocado Grower's Association Yearbook* 10: 64-66.
- KOPP, L.E. (1966) A taxonomic revision of the genus *Persea* in the western hemisphere (*Persea-Lauraceae*). *Memoirs of the New York Botanical Garden* 14 (1): 1-120.
- KOZAI, N., K. BEPPU, R. MOCHIOKA, U. BOONPRAKOB, S. SUBHADRABANDHU, I. KATAOKA (2004) Adverse effects of high temperature on the development of reproductive organs in 'Hakuho' peach trees. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79: 533-537.
- KUMAR A., R.K. CHOWDHURY, O.S. DAHIYA (1995) Pollen viability and stigma receptivity in relation to meteorological parameters in pearl millet. *Seed Science Technology* 23: 147-156.
- KUO, C.G., J.S. PENG, J.S. TSAY (1981) Effect of high temperature on pollen grain germination, pollen tube growth, and seed yield of Chinese cabbage. *HortScience* 16: 67-68.
- LAHAV, E., D.N. ZAMET (1999) Flower, fruitlets and fruit drop in avocado trees. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5: 95-100.
- LAHAV, E., B. GEFEN, D. ZAMET (1970) The effect of girdling on the productivity of the avocado. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 96 (3): 393-398.
- LAHAV, E., U. LAVI, C. DEGANI, D. ZAMET, S. GAZIT (1992) 'Adi', a new avocado cultivar. *HortScience* 27: 1237.
- LAMMERTS. W.E. (1942) Progress report on avocado breeding. *California Avocado Society Yearbook* 27: 36-41.
- LANKINEN, A. (2001) In vitro pollen competitive ability in *Viola tricolor*: temperature and pollen donor effects. *Oecologia* 128: 492-498.
- LAVI, U., J. HILLEL, A. VAINSTEIN, E. LAHAV, D. SHARON (1991) Application of DNA fingerprints for identification and genetic analysis of avocado. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116: 1078-1081.
- LAVI, U., D. SHARON, D. KAUFMAN, D. SAADA, A. CHAPNIK, D.N. ZAMET, C. DEGANI, E. LAHAV, G. SHMUEL (1997) 'Eden' - A New Avocado Cultivar. *HortScience* 32 (1): 151.



- LEBON, G., E. DUCHENE, O. BRUN, C. MAGNE, C. CLEMENT (2004) Flower abscission and inflorescence carbohydrates in sensitive and non-sensitive cultivars of grapevine. *Sexual Plant Reproduction* 17: 71-79.
- LEBON, G., G. WOJNAROWIEZ, B. HOLZAPFEL, F. FONTAINE, VAILLANT-GAVEAU, C. CLÉMENT (2008) Sugars and flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Experimental Botany* 59 (10): 2565-2578.
- LEE, T.D. (1988) Patterns of fruit and seed production. In J. Lovett Doust and L. Lovett Doust [eds.], *Plant reproductive ecology: patterns and strategies*, 179-202. Oxford University Press, New York, NY.
- LEE, C.W., J.C. THOMAS, S.L. BUCHMANN (1985) Factors affecting in vitro germination and storage of jojoba pollen. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 110: 671-676.
- LESLEY, J.W., R.S. BRINGHURST (1951) Environmental conditions affecting pollination of avocados. *California Avocado Society Yearbook* 35: 169-173.
- LEWIS, D. (1942) The physiology of incompatibility in plants. I. Effects of temperature. *Proceedings of the Royal Society London, Series B, Biological Science* 131: 13-26.
- LEWIS, D.H., J.A. CONSIDINE (1999) Pollination and fruit set in the tamarillo [*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.] floral biology. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 27: 101-112.
- LINSKENS, H.F. (1986) Recognition during the progamic phase. In: Cresti M, Dallai R (ed) *Biology of reproduction and cell motility in plants and animals*. University of Siena, Italy, pp. 21-31.
- LINSKENS, H.F., K. ESSER (1957) Über eine spezifische Anfärbung der Pollenschläuche und die Zahl Kallosepropfen nach Selbstung und Fremdung. *Naturwissenschaften* 44:16
- LIU, X., P.W. ROBINSON, M.A. MADORE, G.W. WITNEY, M.L. ARPAIA (1999a) 'Hass' avocado carbohydrate fluctuations. I. Growth and phenology. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124: 671-675.
- LIU, X., R. HOFSHI, M.L. ARPAIA (1999b) 'Hass' avocado leaf growth, abscission, carbon production and fruit set. *Proceedings of avocado Brainstorming. Session 3. Canopy management* 52-55. Riverside.
- LLOYD, D.G. (1980) Sexual strategies in plants. An hypothesis of serial adjustment of maternal investment during one reproductive session. *New Phytologist* 86: 69-79.
- LLOYD, D.G., C.J. WEBB (1986) The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. I. Dichogamy. *New Zealand Journal of Botany* 24: 135-162.



## Bibliografía

- LOESCHER, W.H., T. MCCAMANT, J.D. KELLER (1990) Carbohydrate reserves, translocation, and storage in woody plants roots. *HortScience* 25: 274-281.
- LOMBARD, P.B., M.N. WESTWOOD, M.M. THOMPSON (1971) Effective pollination- the facts of life behind uniform pear cropping. *Proceedings of the Oregon Horticultural Society* 62: 31-36.
- LOPEZ HERRERA, C.J. (1989) Podredumbres radicales del aguacate en la Costa del Sol. Años 1987-88. En *Estudios de Fitopatología* (J. del Moral, ed.): 172-176. SEF/DGIEA.
- LÓPEZ-HERRERA, C.J., R.M. PÉREZ-JIMÉNEZ, M.J. BASALLOTE-UREBA, T. ZEA-BONILLA, J.M. MELERO-VARA (1998) Soil solarization in established avocado trees for *Dematophora necatrix*. *Plant Disease* 82: 1088-1092
- LÓPEZ LÓPEZ, L., A.F. BARRIENTOS PRIEGO, A. BEN YA'ACOV (2001) Study of avocado genetic resources and related kinds species at the Fundación Salvador Sánchez Colin Cictamex S.C. Memoria Fundación Salvador Sánchez Colin CICTAMEX S.C. Coatepec Harinas, México. 1998-2001: 188-201.
- LORA, J., M.A. PÉREZ DE OTEYZA, P. FUENTETAJA, J.I. HORMAZA (2006) Low temperature storage and in vitro germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) pollen. *Scientia Horticulturae* 108: 91-94.
- LORD, E.M. (2003) Adhesion and guidance in compatible pollination. *Journal of Experimental Botany* 54: 47-54.
- LOUPASSAKI, M., M. VASILAKAKIS, I. ANDROULAKIS (1997) Effect of pre-incubation humidity and temperature treatment on the in vitro germination of avocado pollen grains. *Euphytica* 94: 247-251.
- LOVATT, C.J. (1990) Factors affecting fruit set/early fruit drop in avocado. *California Avocado Society Yearbook* 74: 193-199.
- LOVATT, C.J. (2005) Eliminating alternate bearing of 'Hass' Avocado. Continuing project: year 3 of 4. *Proceedings of the California Avocado Research Symposium*, October 29, 2005. University of California, Riverside. pp 75-86.
- LUU, D.T., P. HEIZMANN, C. DUMAS, M. TRICK, M. CAPPADOCIA (1997) Involvement of SLR1 genes in pollen adhesion to the stigmatic surface in Brassicaceae. *Sexual Plant Reproduction* 10: 227-235.
- MAPA (2009) Anuario de Estadística Agroalimentaria. [www.mapa.es/](http://www.mapa.es/) Ultimo acceso abril 2009.
- MARCELIS, L.F.M., E. HEUVELINK, L.R.B. HOFMAN-EIJER, J. DEN BAKKER, L.B. XUE (2004) Flower and fruit abortion in sweet pepper in relation to source and sink strength. *Journal of Experimental Botany* 55: 2261-2268.



- MARSHALL, T.C., J. SLATE, E.B. KRUK, J.M. PEMBERTON (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.
- MARTIN, G., B.O. BERGH (1993) Avocado Breeding. California Avocado Research Symposium pp. 2-4.
- MATLOB, N., W.C. KELLY (1973) The effect of high temperature on pollen tube growth of snake melon and cucumber. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 98 (3): 296-300.
- MCCONCHIE, C.A., D.J. BATTEN, V. VITHANAGE (1994) Intergeneric hybridization between litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) and longan (*Dimocarpus longan* Lour.). *Annals of Botany*, 74, 111-118.
- MCKEE, J., A.J. RICHARDS (1998) The effect of temperature on reproduction in five *Primula* species. *Annals of Botany* 82: 359-374.
- MEHOUACHI, J., D. SERNA, S. ZARAGOZA, M. AGUSTÍ, E. PRIMO-MILLO (1995) Defoliation increases fruit abscission and reduces carbohydrate levels in developing fruits and woody tissue of *Citrus unshiu*. *Plant Science* 107: 189-197.
- MELLENTHIN, W.M., C.Y. WANG, S.Y. WANG (1972) Influence of temperature on pollen tube growth and initial fruit development in d'Anjou' pear. *HortScience* 7: 557-559.
- MHAMEED, S., D. SHARON, D. KAUFMAN, E. LAHAV, J. HILLEL, C. DEGANI, U. LAVI (1997) Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and between *Persea* species. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 279-286.
- MONSELINE, S.P. (1986) Citrus. In: Monseline S.P. ed Handbook of fruit ser and development. Boca Raton, Florida: CRC Press, 87-108.
- MONSELINE, S.P., E.E. GOLDSCHMIDT (1982) Alternate bearing in fruit trees. *Horticultural Reviews* 4: 128-173.
- MONTSERRAT, M., F. DE LA PEÑA, J.I. HORMAZA. J.J. GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ (2008) How do *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) females penetrate densely webbed spider mite nests? *Experimental and Applied of Acarology* 44 (2): 101-106.
- MORENO, Y.M., A.N. MILLER-AZARENKO, W. POTTS (1992) Genotype, temperature, and fall-applied ethephon affect plum flower bud development and ovule longevity. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 117: 14-21.
- MULCAHY, D.L. (1979) The rise of the angiosperms: a geneological factor. *Science* 206: 20-23.



## Bibliografía

- MULCAHY, D.L., G.B. MULCAHY (1975) The influence of gametophytic competition on sporophytic quality in *Dianthus chinensis*. *Theoretical and Applied Genetics* 46: 277–280.
- MULCAHY, D.L., G.B. MULCAHY (1987) The effects of pollen competition. *American Science* 75: 44-50.
- MULCAHY, G.B., D.L. MULCAHY (1983) A comparison of pollen tube growth in bi- and trinucleate pollen. In: *Pollen: biology and implications for plant breeding* (Mulcahy, D.L., Ottaviano, E., Eds), Elsevier, New York. pp. 29-33.
- NASON, J.D., J.L. HAMRICK (1997) Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: Two case studies of neotropical canopy trees. *Journal of Heredity* 88: 264-276.
- NEI, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 70: 3321-3323.
- NEI, M., W.H. LI (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 76: 5269-5273.
- NEPI, M., E. PACINI (1993) Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. *Annals of Botany* 72: 526-536.
- NEWETT, S.D.E., J.H. CRANE, C.F. BALERDI (2002) Cultivars and rootstocks. In: *Avocado: Botany, Production and Uses*. A.W. Wiley, B. Schaffer and B.N. Wolstenholme (eds.) CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- NIEWIADOMSKI, P., S. KNAPPE, S. GEIMER, K. FISCHER, B. SCHULZ, U.S. UNTE, M.G. ROSSO, P. ACHE, U.I. FLUGGE, A. SCHNEIDER (2005) The arabidopsis plastidic glucose 6-phosphate/phosphate translocator GPT1 is essential for pollen maturation and embryo sac development. *Plant Cell* 17: 760-77.
- NIRODY, B.S. (1922) Investigations in avocado breeding. *California Avocado Association Annual Report 1921-1922* pp. 65-78.
- NUÑEZ-ELISEA, R., T.L. DAVENPORT (1986) Abscission of mango fruitlets as influenced by enhanced ethylene biosynthesis. *Plant Physiology* 82: 991 -994.
- OLIVEIRA C.M., C.A. PRIESTLEY (1988) Carbohydrate reserves in deciduous fruit trees. *Horticultural Reviews* 10: 403-430.
- OPPENHEIMER, C.H. (1978) The avocado. *Subtropical fruit trees and their culture in Israel*. Am Oved, Tel Aviv, pp. 51-181.
- PAETKAU, D., W. CALVERT, I. STIRLINGM, C. STROBECK (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4: 347-354.



- PAPADAKIS, J. (1966) Climates of the world and their agricultural potentialities. DAPCO, Rome, 174 pp.
- PAPADEMETRIOU, M.K. (1975a) A study of the viability of avocado pollen under natural conditions. California Avocado Society Yearbook 58: 74-76.
- PAPADEMETRIOU, M.K. (1975b) Pollen tube growth in avocados (*Persea americana* Mill.). California Avocado Society Yearbook 58: 99-102.
- PAPADEMETRIOU, M.K. (1976) Some aspects of the flower behaviour, pollination and fruit set of avocado (*Persea americana* Mill.) in Trinidad. California Avocado Society Yearbook 59: 106-152.
- PASONEN, H.L., P. PULKKINEN, M. KÄPYLÄ, A. BLOM (1999) Pollen-tube growth rate and seed-siring success among *Betula pendula* clones. The New Phytologist 143: 243-251.
- PATTERSON B.D., L. MUTTON, R.E. PAULL, V.Q. NGUYEN (1987) Tomato pollen development: stages sensitive to chilling and natural environment for the selection of resistant genotypes. Plant, Cell & Environment 10: 363-368
- PETERSON, P.A. (1955) Avocado flower pollination and fruit set. California Avocado Society Yearbook 39: 163-169.
- PETERSON, P.A. (1956) Flowering types in avocado with relation to fruit production. California Avocado Society Yearbook 40: 174-177.
- PICTON, J.M., M.W. STEER (1983) Evidence for the role of  $Ca^{+2}$  ions in tip extension in pollen tubes. Protoplasma 115: 11-17.
- PIMIANTA, E., V.S. POLITO (1983) Embryo sac development in almond [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb] as affected by cross, self and non pollination. Annals of Botany, 51: 469-479.
- POLITO, V.S., E. PIMIANTA (1982) A rapid and accurate fluorescence method using ovule whole mounts to assess fertilization in plants. Mikroskopie 39: 32-34.
- POLITO, V.S., J.G. LUZA, S.A. WEINBAUM (1988) Differential low temperature germination responses by pollen of *Pistacia vera* clones with different bloom dates. Scientia Horticulturae 35: 269-274.
- POPENOE, W. (1920) Manual of Tropical and Subtropical Fruits. Macmillan, London, 524 pp.
- POSTWEILLER, K., R. STÖSSER, S.F. ANVARI (1985) The effect of different temperatures on the viability of ovules in cherries. Scientia Horticulturae 25: 235-239.
- POTTS, B.M.; J.B. MARSDEN-SMEDLEY (1989) In vitro germination of Eucalyptus pollen: Response to variation in boric acid and sucrose. Australian Journal of Botany 37: 429-441.



## Bibliografía

- PREUSS, D., B. LEMIEUX, G. YENG, R.W. DAVIS (1993) A conditional sterile mutation eliminates components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes and Development* 7: 974-985.
- QUINLAND, J.D., A.P. PRESTON (1971) The influence of shoot competition on fruit retention and cropping of apple trees. *Journal of Horticultural Science* 46: 525-534.
- RACKHAM, R.L. (1966) Girdling mature Navel orange trees. *Calif. Citrogr.* 51:398-408.
- READ, S.M., A.E CLARKE, A. BACIC (1993) Stimulation of growth of cultured *Nicotiana tabacum* W38 pollen tubes by poly (ethylene glycol) and Cu<sub>II</sub> salts. *Protoplasma* 177:1-14.
- ROBBERTSE, P.J., E. DE WET, L.A COETZER (1988) The influence of temperature and boron on pollen germination of *Mangifera indica* L. *South African mango Growers' Association Yearbook* 8: 4-6.
- ROBBERTSE, P.J., L.A. COETSER, E. TOMER (1994) Pollen/stigma intercompatibility between different avocado cultivars. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 17: 75-77.
- ROBBERTSE, P.J., L.A. COETSER, M.F. JOHANNSMIEIER, D.J. SWART, J.S. KOHNE, T.M. MORUDU (1996) Hass yield and fruit size as influenced by pollination and pollen donor- a joint progress report. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 19: 63-67.
- ROBBERTSE, P.J., L.A. COETSER, M.F. SMITH, W. CONRADIE (1995) Effect of pollen parent on pollen tube growth in Hass avocado. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 18: 17-19.
- ROBBERTSE, P.J., M.F. JOHANNSMIEIER, T.M. MORUDU (1997) Pollination studies in Hass Avocado in relation to the small fruit problem. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 20: 84-85.
- ROBBERTSE, P.J., M.F. JOHANNSMIEIER, T.M. MORUDU (1998) Pollination of Hass avocados. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 21: 63-68.
- ROBINSON, T.R. (1931) Some aberrant forms of flower mechanism in the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 15: 174-179.
- ROBINSON, T.R., E.M.. SAVAGE (1926) Pollination of the avocado. *United States Department of Agriculture Circular* 387: 1-16.
- RODRIGO, J., M. HERRERO (1998) Influence of intraovular reserves on ovule fate in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Sexual Plant Reproduction* 11: 86-93.
- RODRIGO, J., M. HERRERO (2002) The onset of fruiting in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of Applied Botany* 76: 13-19.



- RODRIGO, J., E. RIVAS, M. HERRERO (1997) Starch determination in plant tissues using a computerized image analysis system. *Physiologia Plantarum* 99: 105-110.
- RODRIGO, J., J.I. HORMAZA, M. HERRERO (2000) Ovary starch reserves and flower development in apricot (*Prunus armeniaca*). *Physiologia Plantarum* 108: 35-41.
- RODRIGO, J., J.I. HORMAZA, M. HERRERO (2006) Morphological and physiological parameters related to flower quality in apricot. *Proceedings of the XIIIth International Symposium on Apricot Breeding and Culture* 89-90.
- RODRIGO, J., M. HERRERO, J.I. HORMAZA (en prensa) Pistil traits and flower fate in apricot (*Prunus armeniaca*). *Annals of Applied Biology*.
- ROSELL, P., M. HERRERO, V. GALÁN SAÚCO (1999) Pollen germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). In vivo characterization and optimization of in vitro germination. *Scientia Horticulturae* 81: 251-265.
- ROTMAN, N., F. ROZIER, L. BOAVIDA, C. DUMAS, F. BERGER, J.E. FAURE (2003) Female control of male gamete delivery during fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* 13: 432- 436.
- RUIZ, D., J. EGEEA (2008) Analysis of the variability and correlations of floral biology factors affecting fruit set in apricot in a Mediterranean climate. *Scientia Horticulturae* 115: 154-163
- RUIZ, R., A. GARCIA-LUIS, C. MONERRI, J.L. GUARDIOLA (2001) Carbohydrate availability in relation to fruitlet abscission in Citrus. *Annals of Botany* 87: 805-812.
- RUSSELL, S.D. (1983) Fertilization in *Plumbago zeylanica*: gametic fusion and fate of the male cytoplasm. *American Journal of Botany* 70(3): 416-434.
- RUSSELL, S.D. (1992) Double fertilization. *International Review of Cytology*. 140: 357-388.
- SAHAR, N., P. SPIEGEL-ROY (1984) In vitro germination of avocado pollen. *HortScience* 19(6): 886-888.
- SANZOL, J., M. HERRERO (2001) The effective pollination period in fruit trees. *Scientia Horticulturae* 90: 1-17.
- SANZOL, J., P. RALLO, M. HERRERO (2003) Asynchronous development of stigmatic receptivity in the pear (*Pyrus communis* L. Rosaceae) flower. *American Journal of Botany* 90: 78-84.
- SCHEMSKE, D.W., C. FENSTER (1983) Pollen-grain interactions in a neotropical costus: effect of clump size and competitors. In D.L. Mulcahy and E.Ottaviano (eds.), *Pollen: Biology and Implication for Plant Breedings*, Elsevier, New York. pp. 405-410.



- SCHLICHTING, C.D., A.G. STEPHENSON, L.E. DAVIS, J.A. WINSOR (1987) Pollen competition and offspring variance. *Evolutionary Trends in Plants* 1: 35–39.
- SCHNELL, R.J., J.S. BROWN, C.T. OLANO, E.J. POWER, C.A. KROL, D.N. KUHN, J.C. MOTAMAYOR (2003) Evaluation of avocado germplasm using microsatellite markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128: 881-889.
- SCHOLEFIELD P.B., M. SEDGLEY, D.M. ALEXANDER (1985) Carbohydrate cycling in relation to shoot growth, floral initiation and development and yield in the avocado. *Scientia Horticulturae* 25: 99-110.
- SCHROEDER, C.A. (1954) Some aspects of pollination in avocado. *California Avocado Society Yearbook* 38: 159-162.
- SCORA W.R., N.B. WOLSTENHOLME, U. LAVI (2002) Taxonomy and botany. In: Wiley, W.A., Scaffer, B., and Wolstenholme, B.N. (eds) *The Avocado: Botany, Production and Uses*, CAB International, Wallingford. pp 15–37.
- SEDGLEY, M. (1976) Control of embryo sac over pollen tube growth in the style of avocado (*Persea americana* Mill.). *The New Phytologist* 77: 149-152.
- SEDGLEY, M. (1977a) Reduced pollen tube growth and the presence of callose in the pistil of the male floral stage of the avocado. *Scientia Horticulturae* 7: 27-36.
- SEDGLEY, M., (1977b) The effect of temperature on floral behaviour, pollen tube growth and fruit set in the avocado. *Journal of Horticultural Science* 52: 135-141.
- SEDGLEY, M. (1979) Light-microscope study of pollen-tube growth, fertilization and early embryo and endosperm development in the avocado varieties Fuerte and Hass. *Annals of Botany* 44: 353-359.
- SEDGLEY, M. (1980) Anatomical investigation of abscised avocado flowers and fruitlets. *Annals of Botany* 46: 771- 777.
- SEDGLEY, M. (1987) Flowering, pollination and fruit-set of avocado. *South African Avocado Growers Association Yearbook* 10: 42-43.
- SEDGLEY, M., C.M. ANNELS (1981) Flowering and fruit-set response to temperatures during flowering on floral cycle and pollen tube growth in nine avocado cultivars. *Scientia Horticulturae* 18: 207-213.
- SEDGLEY, M., M.A. BLESING (1982) Foreign pollination of the stigma of watermelon (*Citrullus lanatus* [Thunb.] Matsum and Nakai). *Botanical Gazette* 143: 210–215.
- SEDGLEY, M., M.S. BUTTROSE (1978) Structure of the stigma and style of the avocado. *Australian Journal of Botany* 26: 663-682.



- SEDGLEY, M., W.J.R. GRANT (1983) Effect of low temperatures during the flowering on the floral cycle and pollen tube growth in nine avocado cultivars. *Scientia Horticulturae* 18: 207-213.
- SEDGLEY, M., A. GRIFFIN (1989) *Sexual Reproduction in Tree Crops*. Academic Press. London.
- SEDGLEY, M., P. SCHOLEFIELD (1980) Stigma secretion in the watermelon before and after pollination. *Botanical Gazette* 141: 428-434.
- SEDGLEY, M., P.B. SCHOLEFIELD, D.M.E. ALEXANDER (1985) Inhibition of flowering of Mexican-type and Guatemalan-type avocados under tropical conditions. *Scientia Horticulturae* 25: 21-30.
- SHARON, D., P.B. CREGAN, S. MHAMEED, K. KUSHARSKA, J. HILLEL, E. LAHAV, U. LAVI (1997) An integrated genetic linkage map of avocado. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 911-921.
- SHAW, D.V., A.L. KAHLER, R.W. ALLARD (1981) A multilocus estimator of mating system parameters in plant populations. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 78: 1298-1302.
- SHIMIZU, K.K., K. OKADA (2000) Attractive and repulsive interactions between female and male gametophytes in *Arabidopsis* pollen tube guidance. *Development* 127: 4511-4518.
- SHIVANNA, K.R. (1982) Pollen-pistil interaction and control of fertilization. In: *Experimental Embryology of Vascular Plants* (Ed. by B. M. Johri), Springer-Verlag, Heidelberg. pp. 131-174.
- SHIVANNA, K.R., J. HESLOP-HARRISON (1981) Membrane state and pollen viability. *Annals of Botany* 47: 159-770.
- SHIVANNA, K.R., B.M. JOHRI (1989) *The angiosperm pollen structure and function*. Wiley Eastern Limited, New Delhi.
- SHIVANNA, K.R., N.S. RANGASWAMY (1992) *Pollen Biology- A Laboratory Manual*. Springer, Berlin.
- SHIVANNA, K.R., V.K. SAWHNEY (1995) Polyethylene glycol improves the *in vitro* growth of *Brassica* pollen tubes without loss in germination. *Journal of Experimental Botany* 46: 1771-1774.
- SHIVANNA, K.R., H.F. LINSKENS, M. CRESTI (1991) Pollen viability and vigor. *Theoretical and Applied Genetics* 81: 38-42.
- SHOVAL, S. (1987) Pollination rate and pollen tube growth of avocado in relation to yield. MSc thesis, The Hebrew University of Jerudalen, Rehovot, Israel.
- SHURAKI, Y.D., M. SEDGLEY (1994) Effect of pistil age and pollen parent on pollen tube growth and fruit production of pistachio. *Journal of Horticultural Science* 69: 1019-1027.



- SINGH, A., K.B. EVENSEN, T.H. KAO (1992) Ethylene synthesis and floral senescence following compatible and incompatible pollinations in *Petunia inflata*. *Plant Physiology* 99: 38-45.
- SMITH, R.L. (1984) Sperm competition and the evolution of animal mating systems. Academic Press, New York.
- SNOW, A.A. (1986) Pollination dynamics of *Epilobium canum* (Onagraceae): Consequences for gametophytic selection. *American Journal of Botany* 73: 139-151.
- SNOW, A.A, T.P. SPIRA (1991) Pollen vigor and the potential for sexual selection in plants. *Nature* 352: 196-197.
- SNOW, A.A, T.P. SPIRA (1996) Pollen-tube competition and male fitness in *Hibiscus moscheutos*. *Evolution* 50: 1866–1870.
- SOCIAS I COMPANY, R., D.E. KESTER, M.V. BRADLEY (1976) Effects of temperature and genotype on pollen tube growth in some self-incompatible and self-compatible almond cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 101: 490-493.
- SOLOMON, B.P. (1988) Patterns of pre- and postfertilization resource allocation within an inflorescence: evidence for interovary competition. *American Journal of Botany* 75: 1074–1079.
- SOLTIS, D.E., P.S. SOLTIS, M.W. CHASE, P.K. ENDRESS (2005) *Angiosperm Phylogeny and Evolution*. Sinauer Associates. Sunderland.
- SORNSATHAPORNKUL, P., J.N. OWENS (1998) Pollination biology in a tropical acacia hybrid (*A. Mangium* Willd x *A. Auriculiformis* A. Cunn. ex Benth.). *Annals of Botany* 81: 631-645.
- SORNSATHAPORNKUL, P., J.N. OWENS (1999) Zygotic embryo development in a tropical acacia hybrid (*Acacia mangium* Will x *A. auriculiformis* A. Cunn. Ex Benth.). *International Journal of Plant Science* 160 (3): 445-458.
- SRINIVASAN A., N.P. SAXENA, C. JOHANSEN (1999) Cold tolerance during early reproductive growth of Chickpea (*Cicer arietinum* L.): genetic variation in gamete development and function. *Field Crops Research* 60: 209–222.
- STANLEY, R.G., H.F. LINSKENS (1974) *Pollen Biology, Biochemistry, Management*. Berlin: Springer-Verlag. Stephen, W.P. (1972) *Studies in crop pollination*.
- STEFFEN, J.G., I.H. KANG, J. MACFARLANE, G.N. DREWS (2007) Identification of genes expressed in the Arabidopsis female gametophyte. *Plant Journal* 51: 281-292.
- STEPHENSON, A.G. (1981) Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology and Systematic* 12: 153-179.



- STEPHENSON AG. (1992) The regulation of maternal investment in plants. In: Marshall, C. And Grace, J. (edit.) Fruit and seed production. University Press: Cambridge, United Kingdom. pp 151-171.
- STEPHENSON, A.G., R.I. BERTIN (1983) Mate competition, female choice and sexual selection in plants. In L. Real (ed.), pollination Biology, Academic Press. Orlando. pp.109-149.
- STEPHENSON, A.G., J.A. WINSOR, C.D. SCHLICHTING, L.E. DAVIS (1988) Pollen competition, fertilization, and progeny fitness - a reply to Charlesworth. American Naturalist 132: 303-308.
- STEPHENSON, A.G., T.C. LAU, M. QUESADA, J.A. WINSOR (1992) Factors that affect pollen performance. In: Ecology and evolution of plant reproduction (R. Wyatt, Ed.) Chapman & Hall, New York, USA. pp. 119-134.
- STERN, R. A., S. GAZIT (1998) Pollen viability in lychee. Journal of the American Society for Horticultural Science 123: 41-46.
- STOREY, W.B., B.O. BERGH, G.A. ZENTMYER (1986) The origin, indigenous range and dissemination of the avocado. California Avocado Society Yearbook 70: 127-133.
- STÖSSER, R., S.F. ANVARI (1982) On the senescence of ovules in cherries. Scientia Horticulturae 16: 29-38.
- STOUT, A.B. (1923) A study in cross-pollination of avocado in southern California. California Avocado Association Annual Report 8: 29-45.
- STOUT, A.B. (1927) The flowering behaviours of avocados. Memoirs of the New York Botanical Garden 7: 145-203.
- STOUT, A.B. (1933) The pollination of avocados. Florida Agricultural Experimental Station Bulletin 257: 1-44.
- STOUT, A.B., E.M. SAVAGE (1925) The flower behaviour of avocado with special reference to interplanting. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 38: 80-91.
- SUBBIAH, C.C. (1984) A polyethylene glycol based medium for in vitro germination of cashew pollen. Canadian Journal of Botany 62: 2473-2475.
- SUKHVIBUL, N., A.W. WHILEY, V. VITHANAGE, M.K. SMITH, V.J. DOOGAN, S.E. HETHERINGTON (2000) Effect of temperature on pollen germination and pollen tube growth of four cultivars of mango (*Mangifera indica* L.). Journal of Horticultural Science & Biotechnology 75: 214-222.
- SYVERTSEN, J.P. , J.J. LLOYD (1994) Citrus. In: Environmental physiology of fruit crops. Vol. II. Sub-tropical and Tropical Crops. (Schaffer, B. and Andersen, P. C., Eds). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 65-100.



## Bibliografía

- TANGMITCHAROEN, S., J.N. OWENS (1997) Floral biology, pollination, pistil receptivity and pollen tube growth of teak (*Tectona grandis* Linn f.). *Annals of Botany* 79: 227-241.
- TAYLOR, L.P., P.K. HEPLER (1997) Pollen germination and tube growth. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 461-491.
- THOMPSON, M.M., L.J. LIU (1973) Temperature, fruit set, and embryo sac development in 'Italian' prune. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 101: 620-623.
- TOMER, E., S. GAZIT (1979) Early stages in avocado (*Persea americana* Mill.) fruit development: Anatomical aspects *Botanical Gazette* 140: 304-309.
- TOMER, E., M. GOTTREICH (1975) Observations on the fertilisation process in avocado with fluorescent light. *Euphytica* 24: 31-535.
- TOMER E., M. GOTTREICH, S. GAZIT (1976) Defective ovules in avocado cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 101: 620-623.
- TUINSTRAN, M.R., J. WEDEL (2000) Estimation of pollen viability in grain sorghum. *Crop Science* 40: 968-970.
- VAN DE PEER, Y., R. DE WATCHTER (1994) TREECON for Windows: A software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications in the Biosciences* 10: 569-570.
- VAN WENT, J.L., M.T.M. WILLENSE (1984) Fertilization. In: Johri B (ed) *Embryology of angiosperms*. Springer Berlin, pp 273-318.
- VASILAKAKIS, M., I.C. PORLINGIS (1985) Effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth, effective pollination period, and fruit set of pear. *Horticultural Science* 20: 733-735.
- VISSER, T. (1955) Germination and storage of pollen. *Meded. Landbouwhog. Wageningen* 55: 1-68.
- VITHANAGE, H.I.M.V. (1984) Pollen-stigma interactions: Development and cytochemistry of stigma papillae and their secretions in *Annona squamosa* L. (Annonaceae). *Annals of Botany* 54: 153-167.
- VITHANAGE, V. (1990) The role of the European honeybees (*Apis mellifera* L.) in avocado pollination. *Journal of Horticultural Science* 65: 81-86.
- VRECENAR-GADUS, M., N.C. ELLSTRAND (1985) The effect of planting design on outcrossing rate and yield in the 'Hass' avocado. *Scientia Horticulturae* 27: 215-221.
- WARDLAW, I.F. (1990) Tansley review n° 27 - The control of carbon partitioning in plants. *New Phytologist* 116: 341-381.



- WATSON, M.A., B.B. CASPER (1984) Morphogenetic constraints on patterns of carbon distribution in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 233-259.
- WEINBAUM, S.A., D.E. PARFITT, V.S. POLITO (1984) Differential cold sensitivity of pollen grain germination in two *Prunus* species. *Euphytica* 33: 419-426.
- WHEELER, M.J., V.E. FRANKLIN-TONG, F.C.H. FRANKLIN (2001) The molecular and genetic basis of pollen- pistil interactions. *New Phytologist* 151: 564-584.
- WHILEY, A.W. (1990) CO<sub>2</sub> assimilation of developing fruiting shoots of cv. Hass avocado a preliminary report. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 13: 28- 30.
- WHILEY, A.W. (1992) Avocado varieties and rootstocks- a review. In : *Proceedings of the Avocado Research Workshop*. Queensland Department of Primary Industries, Brisbane, pp 15-20.
- WHILEY, A.W., B.C. WINSTON (1987) Effect of temperature at flowering on varietal productivity in some avocado growing areas in Australia. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 10: 45-47.
- WIEN, H.C., A.D. TURNER, S.F. YANG (1989) Hormonal basis for lo light intensity induced flower bud abscission of pepper. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 114: 981-985.
- WIENS, D., C. CALVIN, C.A. WILSON C.I. DAVERN, D. FRANK, S.R. SEAVY (1987) Ovule survivorship, brood size, life history, breeding systems and reproductive success in plants. *Oecologia* 71: 501-509.
- WILLENSEN, M.T.M., M.A.W. FRANSSEN-VERHEIJEN (1983) Ovular development. In: *Fertilization and Embryogenesis in ovulated palnts*. *Proceedings of the VII International Cytoembryological Symposium*, High Tatra, Bratislava: pp. 177-182.
- WILLIAMS, R.R. (1965) The effects of summer nitrogen applications on the quality of apple blossom. *Journal of Horticultural Science* 40: 31-41.
- WILLIAMS, R.R. (1970) III- Factors affecting pollination in fruit trees. In: *Physiology of tree crops* (L.C. Luckwill, C.V: Cutting, Eds), pp 193-207. Academic Press, London.
- WILLIAMS, L.O. (1977) The avocado, a synopsis of the genus *Persea*, subg. *Persea*. *Economic Botany* 31: 315-320.
- WILMS, H.J. (1980) Development and composition of the spinach ovule. *Acta Botanica Neerlandica* 29: 243- 260.
- WINSOR, J.A., S. PERETZ, A.G. STEPHENSON (2000) Pollen competition in a natural population of *Cucurbita foetidissima* (Cucurbitaceae). *American Journal of Botany* 73: 583-589.



- WITNEY, G., G. MARTIN (1995) Taking the California Avocado breeding program into the next century. Proceedings III World Avocado Congress: 114-118.
- WOLFE, L.M., J.S. SHORE (1992) The mating system of *Hydrophyllum appendiculatum*, a protandrous species. Sexual Plant Reproduction 5: 239-245.
- WOLSTENHOLME, B.N. (1986) Energy cost of fruiting as yield-limiting factor with special reference to avocado. Acta Horticulturae 175: 121-125.
- WOLSTENHOLME, B.N. (1990) Resource allocation and vegetative-reproductive competition: opportunities for manipulation in evergreen fruit trees. Acta Horticulturae 275: 451-459.
- WRIGHT, S. (1951) The genetical structure of populations. Annals of Eugenics 15: 323-354.
- WYSOKI, M., M. A. VAN DEN BERG, G. ISH-AM, S. GAZIT, J.E. PEÑA, G. K. WAITE (2002) Pests and Pollinators of Avocado. In: J. E. Peña, J. L. Sharp, and M. Wysoki [Eds]. Tropical Fruit Pests and Pollinators: Biology, Economic Importance, Natural Enemies and Control. CAB International Publishing. pp. 223-294.
- YEH, F.C., R.C. YOUNG, B. TIMOTHY, T.B.J. BOYLE, Z.H. YE, J.X. MAO (1997) Popgene, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada.
- YI, K., C. GUO, D. CHEN, B. ZHAO, B. YANG, H. REN (2005) Cloning and functional characterization of a formin-like protein (AtFH8) from Arabidopsis. Plant Physiology 138: 1071-1082.
- YI, W.G., S.E. LAWS, D. MCCOY (2006) Stigma development and receptivity in almond (*Prunus dulcis*). Annals of Botany 97(1): 57-63.
- YOUNG, T.W. (1955) Influence of temperature on growth of mango pollen. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 68: 308-313.
- YOUNG, H.J., L. GRAVITZ (2002) The effects of stigma age on receptivity in *Silene alba* (Caryophyllaceae). American Journal of Botany 89: 1237-1241.
- YU, T.S., W.L. LUE, S.M. WANG, J.C. CHEN (2000) Mutation of arabidopsis plastid phosphoglucose isomerase affects leaf starch synthesis and floral initiation. Plant Physiology 123: 319-325.
- ZAMIR, D., S.D. TANKSLEY, R.A. JONES (1981) Low temperature effect on selective fertilization by pollen mixtures of wild and cultivated tomato species. Theoretical and Applied Genetics 59: 235-238.
- ZANIS, M., D.E. SOLTIS, P.S. SOLTIS, S. MATHEWS, M.J. DONOGHUE (2002) The root of the angiosperms revisited. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99: 6848-6853.



ZINKL, G.M., B.I. ZWIEBEL, D.G. GRIER, D. PREUSS (1999) Pollen-stigma interaction in Arabidopsis: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. *Development* 126: 5431-5440.



## **ANEXO 1.**

**Molecular characterization and genetic diversity in an avocado collection of cultivars and local Spanish genotypes using SSRs.**

Hereditas (2007), 144: 244-253.



## Molecular characterization and genetic diversity in an avocado collection of cultivars and local Spanish genotypes using SSRs

M. L. ALCARAZ and J. I. HORMAZA

*Estación Experimental la Mayora – CSIC, Algarrobo-Costa, Málaga, Spain*

**Alcaraz, M. L. and Hormaza, J. I. 2007.** Molecular characterization and genetic diversity in an avocado collection of cultivars and local Spanish genotypes using SSRs. — *Hereditas* 144: 244–253. Lund, Sweden. eISSN 1601-5223. Received July 5, 2007. Accepted October 25, 2007

In this work, 75 avocado accessions maintained in an ex situ germplasm collection at the E.E. la Mayora in Málaga (Spain) were characterized with 16 microsatellites previously developed in this species. This avocado collection includes both local Spanish genotypes obtained through prospection and genotypes obtained by exchange with different countries. A total of 156 different amplification fragments were detected ranging from 4 to 16 per locus with an average of 9.75 alleles per locus. All the microsatellites were highly informative with an expected heterozygosity higher than 0.5 and a probability of identity below 0.36. The total probability of identity was  $2.85 \times 10^{-14}$ . Fifteen of the 16 loci studied showed a positive Wright's fixation index (F) indicating a deficit of heterozygotes with an average over all the SSRs of 0.18. A dendrogram was generated using UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic averages) based on the Nei and Li similarity index. This dendrogram classified most of the genotypes analyzed into three major groups which mainly differed in racial origin although with low bootstrap support probably due to the presence of many interracial hybrids in the collection. All the genotypes studied could be unequivocally distinguished with the combination of SSRs used except some putative mutations of 'Hass' and an additional group of two cultivars. The results obtained indicate that the set of SSRs used is highly informative and are discussed in terms of their implications for avocado germplasm characterization and management.

*J. I. Hormaza, Estación Experimental la Mayora – CSIC, ES-29750 Algarrobo-Costa, Málaga, Spain. E-mail: ihormaza@eelm.csic.es*

Avocado (*Persea americana* Mill.) is an evergreen subtropical fruit tree native to Central America and Mexico with 24 chromosomes ( $n = 12$ ). It is a member of the Lauraceae, a mostly subtropical or tropical family included in the basal angiosperm clade Magnoliid within the order Laurales. Three ecological races or botanical varieties of avocado adapted to different climate conditions have traditionally been recognized: Mexican [*P. americana* var. *drymifolia* (Schlecht. & Cham.) Blake], Guatemalan (*P. americana* var. *guatemalensis* L. Wms.) and West Indian (*P. americana* var. *americana* Mill.). These races are distinguishable on the basis of morphological, physiological and horticultural traits (BERGH 1995; BERGH and LAHAV 1996). Thus, Mexican and Guatemalan races are adapted to cooler climates whereas the West Indian race requires a warmer climate for optimum development. Most commercial avocado cultivars are interracial hybrids developed from chance seedlings. Thus, the most important cultivars in subtropical climates, such as 'Hass', 'Bacon' and 'Fuerte' are Guatemalan  $\times$  Mexican hybrids with different degrees of hybridization (NEWETT et al. 2002).

Total world production has reached more than 3 million tons, although a few countries (Mexico, Indonesia, USA, Colombia, Brazil, Chile, Dominican Republic and Peru) account for more than 70% of that production, Mexico being the main avocado

producing country with more than 1 million tons and 30% of total world production (FAOSTAT 2007). Spain is a special case in avocado cultivation since it is the only European country with a significant commercial production (about 70 000 tons in 2005, FAOSTAT 2007). Moreover, due to the Spanish colonization of the Americas, very old trees are found in continental Spain and in the Canary Islands brought as seeds and planted long before commercial avocado production was established in these areas. Due to climatic conditions, most local avocados in the Canary Islands belong to the West Indian race and in continental Spain to Mexican and Guatemalan races or hybrids between the two, but that is difficult to tell from leaf and fruit examination. As a result of the increasing importance of avocado cultivation in Spain, several cultivars and rootstocks are being studied in order to optimize avocado cultivation. These cultivars and rootstocks include both genotypes obtained in different countries as well as local selections obtained after prospection of elite trees which could be well adapted to local environmental conditions.

The optimization of genetic resource management requires a precise identification of the genotypes as well as a correct evaluation of the amount and distribution of genetic diversity within a species. In avocado, as in other fruit species, morphological characters have traditionally been used to identify

the different genotypes (IPGRI 1995). However, the evaluation of these characters is labor intensive and inaccurate due to the influence of environmental factors, subjectivity and the limiting number of discriminating traits. Therefore, genetic markers have been used in avocado to identify accessions and clarify genetic relationships between different species and genotypes. Thus, minisatellites (LAVI et al. 1991), VNTRs (MHAMEED et al. 1997), RAPDs (FIEDLER et al. 1998), or RFLPs (FURNIER et al. 1990; DAVIS et al. 1998) have been utilized in avocado to fingerprint different sets of cultivars. However, microsatellites show several advantages for genetic fingerprinting such as their codominance and high polymorphism suitable to study diversity and intraspecific relationships, their easy detection through PCR, their even dispersion along the genome, their high reproducibility that allows confident exchange and standardization of protocols among laboratories, their somatic stability and the possibility of cross-species transportability. Recently, several sets of microsatellites have been developed in avocado (SHARON et al. 1997; ASHWORTH et al. 2004, BORRONE et al. 2007) and used for fingerprinting and diversity studies (SCHNELL et al. 2003; ASHWORTH and CLEGG 2003).

Our objectives in this work were the identification of individual accessions and the estimation of genetic diversity within the avocado germplasm collection maintained in E.E. la Mayora in Málaga (Spain) which includes local cultivars and commercial cultivars from different countries using microsatellite markers.

## MATERIAL AND METHODS

### *Plant material*

Seventy-five avocado accessions from different geographical areas and maintained in the avocado collection of the E.E. La Mayora in Málaga (Spain) were analyzed in this study. This collection includes 29 local Spanish genotypes as well as 46 cultivars obtained through exchange with different countries (Table 1). Wherever possible, cultivars were assigned to one of the three avocado classical botanical races (Mexican, Guatemalan and West Indian) following the information from the Variety Database of the Univ. of California at Riverside (<http://www.ucavo.ucr.edu>) and different additional sources (KADMAN and BEN-YA'ACOV 1980a, 1980b, 1981; LAHAV et al. 1992; LAVI et al. 1997; LOPEZ et al. 2001; ASHWORTH and CLEGG 2003; BEN-YA'ACOV et al. 2003; SCHNELL et al. 2003).

### *DNA extraction and SSR analysis*

DNA was isolated from young leaves following the protocol described by HORMAZA (2002). Isolated DNA was subsequently diluted to 10  $\mu$ M with modified TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Sixteen SSRs (Table 2) were selected from those published by SHARON et al. (1997) and ASHWORTH et al. (2004) based on their high polymorphism. PCR amplifications were performed in 15  $\mu$ l vol containing 16 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 67 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.01% Tween20, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM each dNTP, 0.4  $\mu$ M of each primer, 25 ng genomic DNA and 0.5 units of BioTaq<sup>TM</sup> DNA polymerase (Bioline, London, UK). Forward primers were labelled with WellRed fluorescent dyes on the 5' end (Prologo, France). Reactions were carried out on an I-cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) thermocycler using the following temperature profile: an initial step of 1 min at  $94^{\circ}\text{C}$ , 35 cycles of 30 s at  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 s at  $50^{\circ}\text{C}$  and 1 min at  $72^{\circ}\text{C}$ , and a final step of 5 min at  $72^{\circ}\text{C}$ . The PCR products were analyzed by capillary electrophoresis in a CEQ<sup>TM</sup> 8000 capillary DNA analysis system (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Each reaction was repeated at least twice to minimize run-to-run variation.

### *Data analysis*

Allele size determination and the total number of alleles were determined for each SSR locus. Putative alleles were indicated by the estimated size in bp. Genetic diversity was estimated using the following statistics: number of alleles per locus (A), observed heterozygosity ( $H_o$ ) calculated as the number of heterozygous genotypes over the total number of genotypes analyzed for each locus, expected heterozygosity ( $H_e = 1 - \sum p_i^2$  where  $p_i$  is the frequency of the  $i^{\text{th}}$  allele, NEI 1973), effective number of alleles ( $N_e = 1/1 - H_e$ ), Wright's fixation index ( $F = 1 - H_o/H_e$ ) (WRIGHT 1951) and the probability of identity ( $PI = 1 - \sum p_i^4 + \sum \sum (2p_i p_j)^2$ , where  $p_i$  and  $p_j$  are the frequency of the  $i^{\text{th}}$  and  $j^{\text{th}}$  alleles respectively) that measures the probability that two randomly drawn diploid genotypes will be identical assuming observed allele frequencies and random assortment (PAETKAU et al. 1995). Significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium HWE ( $p < 0.01$ ) at individual loci were tested using a Markov chain method. The program ARLEQUIN ver. 3.01 (EXCOFFIER et al. 2005) was used to calculate A,  $H_o$ ,  $H_e$ , allele frequencies (considering  $p < 0.05$ ,  $p > 0.9$  as rare and fixed alleles respectively) and departure from

Table 1. List of the 75 avocado accessions evaluated with SSRs in this study.

Accession	Country of origin	Race	Accession	Country of origin	Race
Acueductos	Spain (Málaga)	Unknown	La Piscina	Spain (Málaga)	Unknown
Adi	Israel	G × M <sup>10</sup>	Lohneiss	USA	Unknown
Alhaurín	Spain (Málaga)	Unknown	Lonjas	Mexico	M <sup>4</sup>
Anaheim	Honduras	G <sup>2,3</sup>	Lula	USA	G × M <sup>3</sup> /G × WI <sup>2,5</sup>
Bacon	USA	G × M <sup>1</sup> /M <sup>2,3</sup>	Maoz	Israel	WI <sup>8</sup>
Bentavol gar	Spain (Málaga)	Unknown	Marvel (BL 516)	USA	G × M <sup>1</sup>
Bentavol inv	Spain (Málaga)	Unknown	Mexicola	USA	M <sup>2,3</sup>
BL 5552	USA	G × M <sup>1</sup>	Monsalve	Spain (Málaga)	
Bueno	Spain (Málaga)	Unknown	Negra de la Cruz	Chile	M <sup>5</sup>
Clavero 2	Spain (Málaga)	Unknown	Nobel (BL667)	USA	G × M <sup>1</sup>
Coín	Spain (Málaga)	Unknown	OA184	USA	G × M <sup>1</sup>
Colin V-33	Mexico	M × G <sup>3</sup>	Pinkerton	USA	G × M <sup>1,2</sup>
Cupanda	Mexico	Unknown	Regal	USA	Unknown
Duke 6	Mexico	M <sup>1</sup>	Rincoatl	Mexico	M <sup>4</sup>
Duke 7	Mexico	M <sup>1</sup>	RR-86	Spain (Canary Islands)	Unknown
Duke Parent	Mexico	M <sup>1</sup>	San Javier 1	Spain (Málaga)	Unknown
Eden	Israel	G × M <sup>6</sup>	San Javier 4	Spain (Málaga)	Unknown
El Viso	Spain (Málaga)	Unknown	San Javier 6	Spain (Málaga)	Unknown
Eugenin	Chile	Unknown	San Javier 8	Spain (Málaga)	Unknown
Fito Chinaa	Spain (Canary Islands)	Unknown	San Javier 11	Spain (Málaga)	Unknown
Fuerte	Mexico	G × M <sup>1</sup>	San Javier 12	Spain (Málaga)	Unknown
Fundacion 2	Mexico	Unknown	San Javier 13	Spain (Málaga)	Unknown
Fuchs 20	Israel	Wi × G <sup>7</sup>	San Javier 14	Spain (Málaga)	Unknown
G-6	Guatemala	M <sup>1</sup>	San Javier 19	Spain (Málaga)	Unknown
G 755 A	Guatemala	G × P. <i>schiedeana</i> <sup>1</sup>	San Javier 28	Spain (Málaga)	Unknown
Gem (3-29-5)	USA	G × M <sup>1</sup> /G <sup>3</sup>	San Javier 29	Spain (Málaga)	Unknown
Gvar 13	Israel	M <sup>9</sup>	S. Chinaa	Spain (Canary Islands)	Unknown
H670	USA	Unknown	Schmidt	Mexico	G <sup>3</sup>
Harvest	USA	G × M <sup>1</sup> /G <sup>3</sup>	Scott	USA	M <sup>3</sup>
Hass	USA	G <sup>1,3</sup> /G × M <sup>2</sup>	Shepard	USA	G <sup>3</sup>
Hass Motril	Spain (Málaga)	Unknown	Shiapacasse	Chile	Unknown
Iriet	Israel	G × M <sup>2</sup>	Sir Prize	USA	M <sup>1</sup>
Jiménez 1	Mexico	Unknown	Tacambaro	Mexico	Unknown
Jiménez 2	Mexico	Unknown	Thomas	USA	M <sup>1</sup>
La Consula 6	Spain (Málaga)	Unknown	Topa Topa	USA	M <sup>1,2,3</sup>
La Consula 9	Spain (Málaga)	Unknown	Toro Canyon	USA	M <sup>1,5</sup>
La Consula 12	Spain (Málaga)	Unknown	Villena	Spain (Málaga)	Unknown
Lamb Hass (BL122)	USA	G × M <sup>1,2</sup>			

Races. G: Guatemalan, M: Mexican, WI: West Indian.

<sup>1</sup>ASHWORTH and CLEGG 2003.

<sup>2</sup>SCHNELL et al. 2003.

<sup>3</sup><http://www.ucavo.ucr.edu>

<sup>4</sup>LOPEZ et al. 2001.

<sup>5</sup>BEN-YA'ACOV et al. 2003.

<sup>6</sup>LAVI et al. 1997.

<sup>7</sup>KADMAN and BEN-YA'ACOV 1981.

<sup>8</sup>KADMAN and BEN-YA'ACOV 1980a.

<sup>9</sup>KADMAN and BEN-YA'ACOV 1980b.

<sup>10</sup>Lahav et al. 1992.

HWE. POPGENE 1.32 software (YEH et al. 1997) was used to calculate  $N_e$  and F. PI was calculated by IDENTITY 1.0 (<http://www.boku.ac.at/zag/forsch/identity.htm>).

Genetic relationships among the genotypes studied were calculated using UPGMA cluster analysis of the similarity matrix obtained from the proportion of

shared amplification fragments (NEI and LI 1979) with NTSYSpc 2.11 (Exeter Software, Stauket; NY, USA). The cophenetic correlation coefficient was computed for the dendrogram after the construction of a cophenetic matrix to measure the goodness of fit between the original similarity matrix and the dendrogram. Bootstrap support values were obtained

Table 2. Locus name, reference, number of alleles ( $A$ ), allele size range, observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosities, Wright's fixation index ( $F$ ),  $P$  test for  $H$ - $W$  equilibrium ( $HWE$ ), effective number of alleles ( $N_e$ ) and probability of Identity ( $PI$ ) calculated for 16 SSRs markers in 75 avocado genotypes.

Locus	Reference	A	Size range (pb)	$H_e$	$H_o$	F	HWE	$N_e$	PI
AVA 12	Sharon et al. (1997)	5	130–142	0.58	0.23	0.61	**	2.31	0.33
AVAG21	Sharon et al. (1997)	14	158–221	0.88	0.67	0.24	**	7.26	0.06
AVAG22	Sharon et al. (1997)	10	103–137	0.83	0.76	0.08	**	5.67	0.10
AVD 001	Ashworth et al. (2004)	16	208–267	0.86	0.63	0.27	**	6.83	0.07
AVD 003	Ashworth et al. (2004)	8	183–208	0.85	0.72	0.15	**	6.28	0.09
AVD 006	Ashworth et al. (2004)	14	301–348	0.84	0.61	0.27	**	5.59	0.08
AVD 013	Ashworth et al. (2004)	10	198–253	0.66	0.65	0.02	0,08	2.97	0.31
AVD 017	Ashworth et al. (2004)	9	170–223	0.78	0.64	0.18	**	4.44	0.13
AVD 018	Ashworth et al. (2004)	8	189–235	0.66	0.63	0.05	0,59	2.84	0.21
AVD 022	Ashworth et al. (2004)	10	220–258	0.77	0.72	0.07	**	4.31	0.17
AVO 102	Ashworth et al. (2004)	12	154–201	0.83	0.85	–0.03	**	5.44	0.11
AVT 226	Ashworth et al. (2004)	6	294–327	0.69	0.63	0.09	0,10	3.19	0.21
AVT 372	Ashworth et al. (2004)	5	172–185	0.72	0.68	0.05	0,12	3.42	0.24
AVT 386	Ashworth et al. (2004)	4	220–234	0.63	0.56	0.11	0,40	2.69	0.36
AV MIX03	Sharon et al. (1997)	14	145–190	0.80	0.69	0.13	**	4.84	0.10
AV MIX04	Sharon et al. (1997)	11	160–194	0.81	0.56	0.30	**	4.76	0.11
Mean		9.75		0.76	0.64	0.18		4.55	0.17

\*\*Significant at  $P \leq 0.01$ .

from 2000 replicates using the program Treecon 1.3b (VAN DE PEER and DE WATCHTER 1994).

## RESULTS AND DISCUSSION

In this work, we have analyzed with 16 SSRs an avocado collection that contains 75 genotypes including local Spanish accessions together with genotypes obtained through exchange with germplasm collections in different countries. The race of most of those cultivars has been reported previously in the literature (Table 1).

### SSR polymorphism and genetic diversity

The parameters of variability are presented in Table 2. A total of 156 amplification fragments were detected with the 16 SSRs studied. The number of alleles per locus ranged from 4 (AVT 386) to 16 (AVD 001) with an average of 9.75 alleles per locus. This value is very similar to the 10.4 alleles per locus reported by ASHWORTH and CLEGG (2003) with 25 SSR loci and 37 genotypes although significantly lower than the value of 18.8 obtained by SCHNELL et al. (2003) with 14 loci, probably due to the higher number (224) and dissimilarity of the accessions studied in the latter work. The range of allele sizes obtained in this work was similar to those reported for the same SSRs by SCHNELL et al. (2003) and ASHWORTH and CLEGG (2003) confirming the reliability of SSR analyses performed in different laboratories. All the selected microsatellites amplified one or two fragments per

genotype and, consequently, they were considered as single locus SSRs.

Allele frequencies ranged from 0.006 to 0.55. No fixed alleles (allele frequency  $>0.9$ ) were detected and 83 alleles (53%) can be considered as rare (allele frequency  $<0.05$ ). Six local accessions ('Acueducto', 'Bentavol gar', 'Bentavol inv', 'Clavero 2', 'Monsalve' and 'San Javier 28') and eight cultivars from different countries ('Adi', 'Marvel', 'G 775A', 'Harvest', 'Lonjas', 'Lula', 'Mexicola' and 'Negra de la Cruz') showed the presence of one genotype-specific fragment. A high level of polymorphism was obtained in most of the loci studied since nine of the 16 loci revealed 10 or more alleles in the accessions studied. Consequently, all the microsatellites selected are highly informative with  $H_e \geq 0.5$  and  $PI \leq 0.35$  except the locus AVT386 which shows the minimum number of alleles (4) and the maximum PI (0.36).

Observed heterozygosity ranged from 0.22 in AVA12 to 0.85 in AVO102 (mean of 0.64). Expected heterozygosity ranged from 0.58 in AVA12 to 0.88 in AVAG21 (mean of 0.76). The comparison between the two parameters was carried out based on the Wright's fixation index ( $F$ ). For 15 loci this parameter was positive, meaning a deficit of heterozygotes, whereas for only one locus (AVO102)  $F$  was negative, with an average over all the SSRs of 0.18 showing an overall heterozygote deficiency. These results indicate a certain degree of inbreeding which could be explained by the fact that some genotypes are genetically related. These observations are consistent with those obtained in other works in avocado using SSRs (SCHNELL et al.

2003; BORRONE et al. 2007). Significant departure over Hardy-Weinberg expectations ( $p < 0.01$ ) was observed for 11 loci; this is expected taking into account the nature of the material tested that does not represent a random sample of genotypes. The maximum probability of identity (0.36) was observed with AVT 386, with four alleles, and the minimum (0.06) in AVAG21 with 14 alleles. The average was 0.17 and the total probability identity was  $2.85 \times 10^{-14}$ . The value of  $N_e$  ranged from 2.31 (AVA 12) to 7.26 (AVAG 21) with an average of 4.55. The value of all those parameters, especially the expected heterozygosity which is higher than 0.5 and the probability of identity that is below 0.36, indicate that microsatellites selected form a highly informative set useful for avocado germplasm characterization.

#### Identification of the different accessions

The different amplification fragment combinations with 16 SSRs allowed us to distinguish 66 different profiles; of those, 64 correspond with unique genotypes, and the remaining 11 form two groups of 9 and 2 identical accessions. The group of nine undistinguishable accessions includes 'Hass' (the most widely grown cultivar worldwide and well adapted to Mediterranean climates) and eight Hass-like accessions very similar at the morphological level that could indicate an origin from 'Hass' by mutation. The second is formed by the accessions 'Colin V33' and 'Shepard' which we would expect to be different and, consequently, this synonymy could probably be due to an error in our collection. The observation that all the Hass-like accessions studied showed the same genetic profile as 'Hass' shows the reliability of the methods used in this work to generate and analyze SSR data.

Similarity values among the different avocado accessions ranged from 0.04 ('Topa Topa' and 'Shepard', 'Colin V33' and 'Rincoatl') to 0.96 ('Duke 6' and 'Duke Parent') with an average of 0.19 among all the accessions.

Unfortunately, there are no published data of SSR allele sizes for most avocado cultivars in the literature. We have been able to compare only two cultivars included in previous studies with some of the microsatellites used in this work: 'Hass' in ASHWORTH et al. 2004 and 'Pinkerton' in SHARON et al. 1997 and SCHNELL et al. 2003. Regarding 'Hass' very similar fragment sizes are obtained for 7 out of the 10 loci included in both studies. The divergent fragment sizes detected by ASHWORTH et al. (2004) were likely caused by the use of contrasting methodologies (sequencing of the microsatellite-containing clones versus fragment analysis) that opens up the opportunity for modified fragment lengths. In fact ASHWORTH (pers. comm.)

obtained similar fragment sizes as those reported in this work with fragment analysis on an automatic DNA analyzing system, corroborating the general consensus that within the same medium the fragments are very similar or identical in size. Regarding 'Pinkerton' four loci can be compared between this work and those of SHARON et al. 1997 and SCHNELL et al. 2003 (AVAMIX03, AVAG21, AVAG22 and AVAMIX04). The results are very similar to those of SCHNELL et al. 2003, our fragments being about 4 bp larger. Most of the differences reported between these two works and the results of SHARON et al. (1997) could be mainly due to the use of automatic fragment analysis systems in the former as opposed to the use of polyacrylamide electrophoresis in the latter. In any case, we cannot rule out the possibility that similar problems could occur with other cultivars that have not been studied in other works. Further work is clearly needed with genotypes from different sources to clarify this point. Thus, we include a Table (Table 3) with the sizes obtained with the cultivars analyzed in this study in order to allow the comparison with the results obtained by other research groups to establish a common nomenclature to optimize avocado germplasm management and exchange.

#### Similarity relationships among accessions

The dendrogram generated from UPGMA cluster analysis based on the Nei and Li similarity index showed a cophenetic correlation coefficient of 0.83 which means a good fit between the cophenetic and the similarity matrixes. The dendrogram is presented in Fig. 1. The most divergent accession is G755A, identified with isozyme analyses as an interspecific hybrid between *P. americana* and *P. schiedeana* (ELLSTRAND et al. 1986), that clusters separately from the rest of the genotypes. A small group that includes a West Indian cultivar ('Maoz'), a Mexican ('Gvar13'), a Guatemalan ('Anaheim') and a G × WI hybrid ('Fusch 20') also clusters separately from the rest of the genotypes analyzed.

The rest of the genotypes in the dendrogram could be roughly divided into two main clusters with no bootstrap support and with accessions of different origin intermixed. In the upper group of the dendrogram we find mostly cultivars of Mexican race, including 'Topa-Topa', 'G6', 'Duke 6', 'Duke 7', 'Duke Parent', 'Mexicola', 'Scott', 'Thomas' or 'Bacon' (sometimes reported as G × M hybrid) as well as a Guatemalan genotype ('Schmidt'), some G × M hybrids such as 'Marvel' or 'Lula' (sometimes reported as G × WI) and 'Cupanda' (of unknown race); the rest are 20 local Spanish genotypes of unknown pedigree collected in Málaga and one genotype from

Table 3. Amplification fragments obtained with 16 SSR loci in the 75 avocado accessions evaluated in this study.

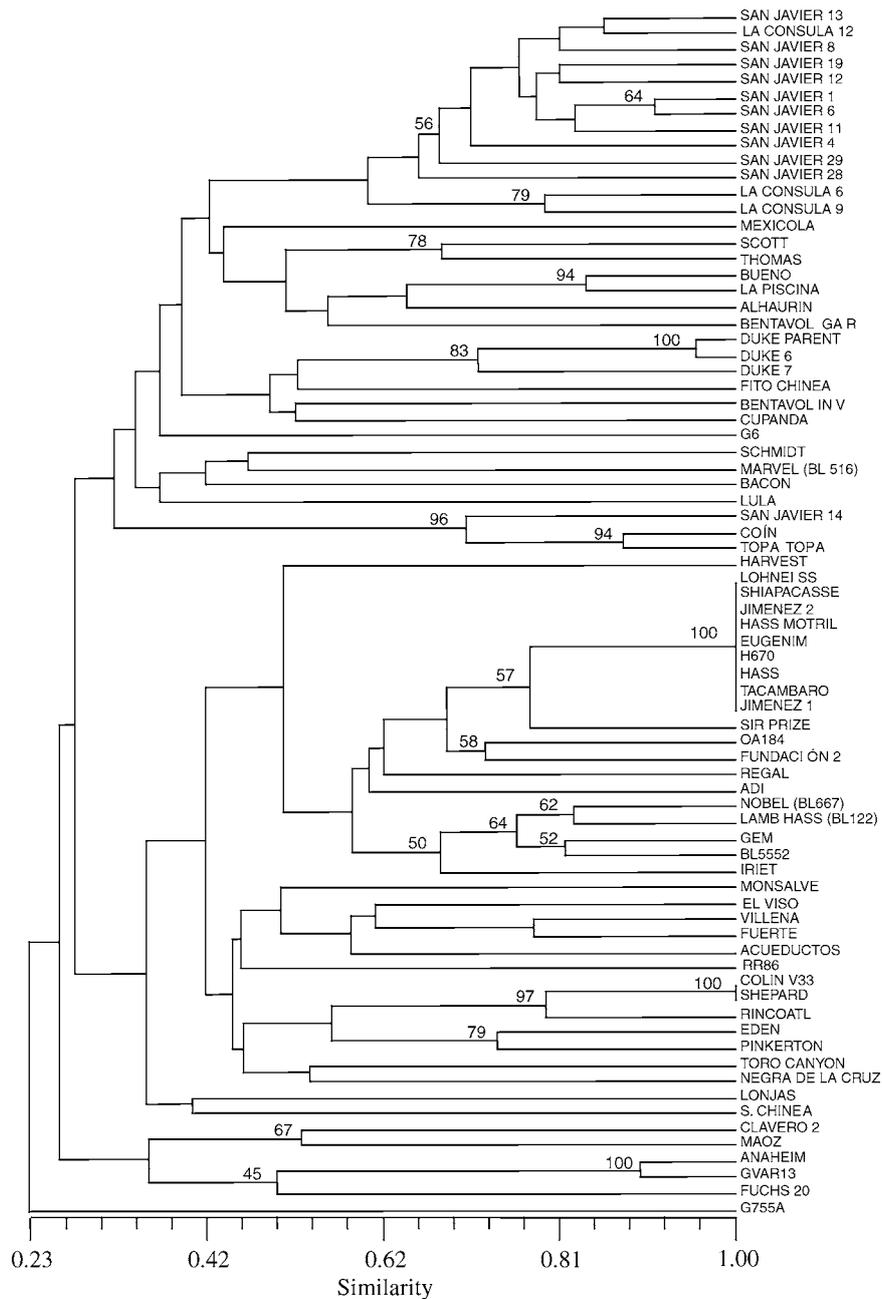
	AVA12	AVAG21	AVAG22	AVD001	AVD003	AVD006	AVD013	AVD017	AVD018	AVD022	AVD102	AVT226	AVT372	AVT386	AVMIX03	AVAMIX04
Acueductos	133/133	175/203	110/125	242/242	186/203	341/341	220/220	170/188	214/224	250/258	154/172	296/309	185/185	220/230	147/147	162/181
Adi	135/135	185/203	115/125	225/242	190/203	303/324	217/236	172/214	214/224	223/223	194/199	300/309	172/185	230/230	147/151	181/181
Alharurín	130/130	183/183	103/110	225/235	194/194	322/330	220/220	170/170	189/224	223/250	158/194	300/303	181/181	220/220	176/176	162/184
Anaheim	133/133	183/183	106/106	225/235	190/203	330/341	217/220	170/172	204/230	230/230	160/162	294/300	175/185	224/230	147/159	164/181
Bacon	133/135	158/183	106/130	242/242	186/199	303/330	217/220	170/198	203/214	225/250	158/160	296/303	182/175	220/230	147/174	168/172
Bentavol gar	130/130	183/207	103/103	225/238	194/194	301/301	220/220	170/188	189/189	223/230	154/160	296/303	175/185	220/224	147/185	184/184
Bentavol inv	135/135	203/203	103/127	254/265	190/194	322/322	220/220	170/170	224/224	220/233	158/167	300/300	181/185	220/220	147/147	162/168
BL5552	135/135	171/201	121/125	242/242	183/188	318/341	217/220	170/214	214/224	225/225	154/160	294/303	172/185	230/230	147/174	181/181
Bueno	130/135	183/183	103/110	230/252	194/194	318/318	217/220	170/186	189/224	223/250	158/160	300/300	175/185	220/224	147/169	162/184
Clavero 2	140/140	181/181	110/110	230/230	190/190	316/348	220/220	178/223	230/230	230/247	194/194	300/300	175/175	230/230	145/154	174/174
Colín	133/133	183/183	106/110	240/240	188/188	341/341	217/217	188/188	224/224	258/258	154/158	296/296	172/181	220/220	180/190	162/162
Colín V-33 <sup>1</sup>	135/135	171/171	121/125	242/242	183/186	303/330	220/253	170/198	214/230	230/250	160/194	300/309	175/175	220/220	169/174	181/186
Cupanda	130/135	183/192	106/127	240/254	194/194	318/322	217/220	170/170	203/224	223/230	158/158	300/327	175/185	220/220	147/180	181/181
Duke 6	130/130	192/192	127/130	254/267	190/194	318/318	217/217	170/170	224/224	256/256	158/160	300/300	181/185	224/224	147/147	160/184
Duke 7	130/135	203/203	106/130	244/267	194/199	318/318	217/220	170/170	224/224	250/256	158/160	294/300	181/185	224/230	147/147	160/181
Duke Parent	130/130	192/203	127/130	254/267	190/194	318/318	217/217	170/170	224/224	250/256	158/160	300/300	181/185	224/224	147/147	160/184
Eden	135/135	185/203	121/130	242/242	186/186	330/330	217/220	170/170	221/230	223/250	160/199	300/309	172/185	230/230	147/162	172/181
El Viso	135/135	197/203	106/110	225/242	186/203	303/341	220/242	170/170	214/224	250/258	154/170	300/309	172/185	220/230	147/174	162/181
Fito China	130/130	171/203	106/130	249/267	194/194	322/341	217/217	170/170	221/224	250/258	158/170	300/300	185/185	220/220	147/185	168/168
Fuertes	135/135	183/203	106/125	225/242	186/203	303/318	220/242	170/214	214/224	223/250	154/170	300/309	172/185	220/230	147/174	162/181
Fuchs 20	133/140	181/181	106/125	230/240	190/203	330/341	220/250	170/172	224/230	225/258	192/194	300/309	175/181	230/230	154/159	176/176
Fundacion 2	135/135	185/201	106/121	227/242	186/203	318/324	217/242	172/214	224/230	230/250	154/158	303/309	172/175	224/230	147/162	162/181
G-6	135/135	203/171	106/106	246/249	183/183	306/306	217/217	170/170	189/189	225/233	154/160	300/300	175/181	220/224	147/147	162/174
G 755 A	135/135	187/187	125/125	208/267	186/194	303/336	198/250	172/194	221/221	223/223	158/162	300/303	172/181	220/224	151/176	174/174
Gem (3-29-5)	135/135	171/201	121/125	225/225	183/183	324/341	217/220	170/214	214/224	230/230	154/160	300/303	172/185	224/230	147/174	181/181
Gvar 13	133/133	183/221	106/106	227/235	190/201	330/341	217/220	170/172	224/230	230/247	160/162	294/300	175/185	224/230	147/159	164/181
Harvest	135/135	181/201	117/125	242/246	183/190	341/341	217/250	172/214	224/235	223/230	160/194	294/303	172/181	224/230	159/174	181/181
Hass <sup>2</sup>	135/135	185/201	121/125	225/225	183/203	318/324	217/242	172/214	224/224	223/230	154/199	300/303	172/185	230/230	147/162	181/181
Hass Motril	135/135	185/201	121/125	225/225	183/203	318/324	217/242	172/214	224/224	223/230	154/199	300/303	172/185	230/230	147/162	181/181
Iriet	135/135	171/201	121/125	227/242	186/203	324/341	220/242	172/214	214/214	223/230	154/160	300/303	172/185	230/230	147/174	172/181
La Cónsula 6	130/130	171/207	110/110	225/249	194/201	318/318	217/220	170/188	224/224	223/250	154/158	296/303	185/185	220/224	169/176	162/174
La Cónsula 9	130/130	171/207	106/110	225/249	194/201	318/318	217/220	170/186	189/224	223/223	154/158	296/303	185/185	224/230	169/169	162/174
La Cónsula 12	130/135	171/183	106/110	230/249	201/201	318/318	217/217	178/188	224/224	223/250	154/154	300/300	185/185	220/230	169/169	174/194
Lamb Hass (BL122)	135/135	183/201	121/121	227/242	183/188	318/341	217/220	170/214	214/224	223/230	154/160	303/303	172/172	224/230	174/174	181/186
La Piscena	130/130	183/183	103/110	225/252	194/201	318/318	217/220	170/170	189/224	223/250	154/160	300/300	175/185	220/224	147/176	162/184
Lonjas	133/133	183/201	110/125	227/249	188/203	313/318	224/242	172/223	206/224	223/241	154/167	300/303	175/185	220/230	145/145	176/181
Lula	130/135	183/203	110/130	242/242	183/194	332/341	220/234	172/172	221/230	223/223	154/158	300/303	175/175	224/234	147/162	162/176
Maoz	142/142	221/221	121/121	230/242	201/201	341/341	220/220	178/178	230/230	230/230	194/201	300/300	175/175	230/230	154/154	176/176
Marvel (BL 516)	133/133	183/183	110/121	242/242	190/190	318/341	220/220	170/172	214/214	223/230	158/158	296/303	172/175	220/224	171/185	162/181
Mexicola	135/135	195/195	103/106	233/242	194/194	330/341	217/220	170/188	189/224	223/247	158/162	303/327	178/181	220/230	169/169	162/184
Monsalve	135/135	203/203	103/125	225/254	183/203	303/318	231/242	170/170	214/230	230/250	154/160	300/327	185/185	220/220	147/174	168/181
Negra de la Cruz	135/135	171/192	106/125	242/242	183/203	318/341	217/220	170/172	214/224	223/223	158/194	296/309	181/185	220/230	162/194	162/194
Nobel (BL667)	135/135	171/201	121/125	227/242	183/183	341/341	220/220	170/214	214/224	230/230	154/199	303/303	172/172	224/230	174/174	181/186
OAl84	135/135	158/185	121/125	227/242	186/203	324/324	217/217	198/214	224/230	230/230	154/199	303/303	172/172	230/230	147/162	181/181

Table 3 (Continued)

	AVA12	AVAG21	AVAG22	AVD001	AVD003	AVD006	AVD013	AVD017	AVD018	AVD022	AVD102	AVT226	AVT372	AVT386	AVMIX03	AVAMIX04
Pinkerton	135/135	185/203	121/121	225/244	183/186	324/330	217/220	170/214	221/224	223/250	194/199	300/309	172/185	230/230	147/169	181/181
Regal	135/135	201/192	125/125	225/225	183/183	318/344	220/242	214/214	214/224	223/230	160/199	300/303	185/185	220/220	147/174	181/181
Rincoatl	135/135	171/203	121/125	242/242	183/186	303/330	220/253	170/172	214/221	230/250	170/194	309/309	172/185	220/230	147/169	181/186
RR-86	135/135	181/181	106/121	225/242	194/203	303/316	220/220	170/223	224/230	223/250	154/194	300/300	172/175	220/230	145/174	162/176
San Javier 1	130/135	171/183	106/110	249/249	194/201	344/344	220/220	178/186	221/224	250/250	154/158	300/300	175/185	220/230	145/169	174/174
San Javier 4	130/135	171/203	110/130	230/244	194/201	306/318	220/220	170/178	224/224	223/250	154/158	294/300	175/185	220/230	147/169	174/194
San Javier 6	130/135	171/183	106/110	230/249	194/201	318/344	217/220	178/186	221/224	223/250	154/158	300/300	175/185	220/230	145/169	174/194
San Javier 8	130/135	183/183	110/110	230/249	194/201	318/344	217/220	188/188	224/224	223/250	154/158	300/300	175/175	230/230	169/169	174/194
San Javier 11	130/135	171/181	106/110	230/249	194/201	306/344	217/220	186/186	221/224	223/250	154/158	300/300	185/185	220/230	169/169	174/174
San Javier 12	135/135	171/171	106/110	230/249	194/201	306/306	217/217	178/186	221/224	223/250	158/158	300/300	185/185	220/220	147/169	174/174
San Javier 13	130/135	171/171	106/110	230/249	201/201	318/318	217/220	178/188	221/224	250/250	158/158	300/300	185/185	220/230	169/169	174/194
San Javier 14	133/133	183/183	106/130	242/242	188/201	324/324	217/217	170/178	224/224	223/258	154/158	296/296	175/175	220/220	147/180	162/162
San Javier 19	130/135	171/181	106/110	230/249	194/201	306/306	217/220	178/188	221/224	250/250	154/158	300/300	175/185	220/234	147/169	174/194
San Javier 28	135/140	171/181	110/110	249/254	201/201	344/344	220/220	178/178	224/230	223/250	158/190	300/300	175/185	220/230	151/169	174/194
San Javier 29	130/130	181/181	106/106	230/249	194/201	344/344	220/220	178/188	221/224	223/258	154/154	300/300	175/175	220/230	147/169	174/174
S. Chinaea	135/135	192/201	103/106	235/235	188/203	301/318	220/220	170/170	224/224	223/223	154/192	294/300	181/185	220/220	151/151	162/181
Schmidt	130/135	183/183	110/110	249/254	190/190	318/318	217/217	170/170	214/230	250/256	158/158	296/303	185/185	220/224	147/147	174/174
Scott	133/133	175/183	106/137	235/246	194/199	318/318	220/220	170/170	189/221	250/250	158/162	300/327	175/185	220/224	147/147	162/162
Shepard	135/135	171/171	121/125	242/242	183/186	303/330	220/253	170/198	214/230	230/250	160/194	300/309	172/181	220/230	169/174	181/186
Sir-Prize	135/135	185/201	121/121	225/225	183/183	318/341	217/242	214/214	224/224	230/230	160/199	300/303	172/172	230/230	162/174	181/181
Thomas	133/133	183/197	106/137	225/246	199/199	318/318	217/220	170/170	189/224	223/250	158/158	300/327	181/185	220/220	147/147	168/184
Topa Topa	133/133	175/183	106/110	240/242	188/208	301/301	217/217	188/188	224/224	258/258	154/158	294/296	175/175	220/220	180/190	162/162
Toro Canyon	135/135	171/192	127/127	240/244	183/188	330/341	217/220	170/170	221/224	250/258	170/170	296/309	172/185	220/230	147/147	162/181
Villena	135/135	171/183	106/125	225/235	186/203	318/341	220/242	170/214	214/224	230/250	167/167	300/300	172/185	220/230	147/147	162/181

<sup>1</sup>Shepard has the same SSR profile than Colin V-33.

<sup>2</sup>The following accessions have the same SSR profile than Hass: Eugenin, H670, Jimenez1, Jimenez2, Lonheis, Shiapacasse and Tacambaro.



**Fig. 1.** Dendrogram of 75 avocado genotypes based on UPGMA analysis using the similarity matrix generated by the Nei and Li coefficient. The numbers above nodes indicate bootstrap values (only the values larger than 50% are shown).

the Canary Islands. The Mexican race is adapted to semitropical climates and shows a higher cold tolerance (BERGH and ELLSTRAND 1986) and, based on the results obtained we can hypothesize that most of the local accessions collected in continental Spain are of the Mexican race or G × M hybrids where the Mexican race is prevalent. Regarding the local genotypes a solid cluster with significant bootstrap support groups genotypes of ‘San Javier’ and ‘La Consula’ that

were obtained from the same location as well as ‘Coin’ with ‘Topa Topa’ suggesting that ‘Coin’ could be a ‘Topa Topa’ seedling.

The second group contain cultivars of diverse origin. In the second group we can find mostly G × M hybrid genotypes [‘Harvest’, sometimes considered Guatemalan, ‘Hass’, sometimes considered Guatemalan, ‘OA184’, ‘Adi’, ‘Nobel’, ‘Lamb Hass’, ‘Gem’ – sometimes considered as Guatemalan-, ‘BL 5552’,

'Iriet', 'Fuerte', 'Colin V33', 'Pinkerton' and its seedling 'Eden' (LAVI et al. 1997)] together with some Mexican (such as 'Sir Prize -traditionally considered as a descendant of 'Hass', 'Negra de la Cruz', 'Rincoatl', 'Toro Canyon' and 'Lonjas'). In this group we can also find 6 of the Spanish accessions (four from Malaga and two from the Canary Islands). With the combination of SSRs employed a clear grouping based in the racial origin of the different cultivars cannot be determined. This could be due to the fact that most of the cultivars maintained in the collection are hybrids and the number of pure Guatemalan and West Indian genotypes is very low. These results agree with previous works using molecular markers (ASHWORTH and CLEGG 2003) where the presence of hybrid genotypes decrease the genetic distance between the groups of the respective parents. Previous works with morphological characters (KOPP 1966) and different molecular markers have clustered together Guatemalan and West-Indian accessions (BUFLER and BEN YA'ACOV 1992; FIEDLER et al. 1998; MHAMEED et al. 1997). However, other works using isozymes (GOLDRING et al. 1985), morphological characters (BERGH and LAHAV 1996) and molecular markers (FURNIER et al. 1990) could differentiate between the races. Additional work with a larger number of molecular markers and using genotypes correctly assigned to each race is needed to address this point.

*Acknowledgements* – Financial support for this work was provided by the Spanish Ministry of Education (Project Grant AGL2004-02290/AGR). M. L. A. was supported by an I3P doctoral grant of CSIC. We gratefully acknowledge J. M. Hermoso for valuable information on avocado germplasm.

## REFERENCES

- Ashworth, V. E. T. M. and Clegg, M. T. 2003. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. – *J. Hered.* 94: 407–415.
- Ashworth, V. E. T. M., Kobayashi, M. C., De La Cruz, M. et al. 2004. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): development of dinucleotide and trinucleotide markers. – *Sci. Hortic.* 101: 255–267.
- Ben-Ya'acov, A., Zilberstaine, M., Goren, M. et al. 2003. The Israeli avocado germplasm bank: where and why the items had been collected. – *Proc. V World Avocado Congr.*, pp.13–19.
- Bergh, B. O. 1995. Avocado. – In: Smartt, J. and Simmonds, N. W. (eds), *Evolution of crop plants*. Longman Scientific & Technical, pp. 240–245.
- Bergh, B. O. and Ellstrand, N. 1986. Taxonomy of avocado. – *Calif. Avocado Soc. Yearbook* 70: 135–146.
- Bergh, B. O. and Lahav, E. 1996. Avocados. – In: Janick, J. and Moore, J. N. (eds), *Fruit breeding, Vol. 1. Tree and tropical fruits*. John Wiley and Sons, pp. 113–166.
- Borrone, W. J., Schnell, R. J., Violy, H. A. et al. 2007. Seventy microsatellite markers from *Persea americana* Miller (avocado) expressed sequences tags. – *Mol. Ecol. Notes* 7: 439–444.
- Bufler, G. and Ben Ya'acov, A. 1992. A study of avocado germplasm resources, 1988–1990. – *Proc. 2nd World Avocado Congr.* 2: 545–550.
- Davis, J., Henderson, D., Kobayashi, M. et al. 1998. Genealogical relationships among cultivated avocado as revealed through RFLP analysis. – *J. Hered.* 89: 319–323.
- Ellstrand, N. C., Lee, J. M., Bergh, B. O. et al. 1986. Isozymes confirm hybrid parentage for 'G755' selections. – *Cal. Avocado Soc. Yearbook* 70: 199–203.
- Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. 2005. Arlequin (ver. 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. – *Evol. Bioinf. Online* 1: 47–50.
- Faostat. 2007. Agriculture data. <http://faostat.fao.org/>. Accessed June 2007
- Fiedler, J., Bufler, G. and Bangerth, F. 1998. Genetic relationships of avocado (*Persea americana* Mill.) using RAPD markers. – *Euphytica* 101: 249–255.
- Furnier, G. R., Cummings, M. P. and Clegg, M. T. 1990. Evolution of the avocados as revealed by DNA restriction site variation. – *J. Hered.* 81: 183–188.
- Goldring, A., Zamir, D. and Degani, C. 1985. Duplicated phosphoglucose isomerase genes in avocado. – *Theor. Appl. Genet.* 71: 491–494.
- Hormaza, J. I. 2002. Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequences repeats. – *Theor. Appl. Genet.* 104: 321–328.
- IPGRI 1995. Descriptors for avocado (*Persea* spp.). – *Int. Plant Genet. Resour. Inst.*, Rome, Italy.
- Kadman, A. and Ben-Ya'acov, A. 1980a. Maoz avocado rootstock selection. – *HortScience* 15: 207.
- Kadman, A. and Ben-Ya'acov, A. 1980b. G.A.-13 avocado rootstock selection. – *HortScience* 15: 206.
- Kadman, A. and Ben-Ya'acov, A. 1981. 'Fuchs-20' avocado rootstock. – *HortScience* 16: 351.
- Kopp, L. E. 1966. A taxonomic revision of the genus *Persea* in the western Hemisphere (*Persea-Lauraceae*). – *Mem. N. Y. Bot. Gard.* 14: 1–120.
- Lahav, E., Lavi, U., Degani, C. et al. 1992. 'Adi', a new avocado cultivar. – *HortScience* 27: 1237.
- Lavi, U., Hillel, J., Vainstein, A. et al. 1991. Application of DNA fingerprints for identification and genetic analysis of avocado. – *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 116: 1078–1081.
- Lavi, U., Sharon, D., Kaufman, D. et al. 1997. 'Eden' – a new avocado cultivar. – *HortScience* 32: 151.
- López López, L., Barrientos Priego, A. F. and Ben Ya'acov, A. 2001. Study of avocado genetic resources and related kinds species at the Fundacion Salvador Sanchez Colin Cictamex S.C. – *Mem. Fundación Salvador Sánchez Colin CICTAMEX S.C. Coatepec Harinas, México.* 1998–2001: 188–201.
- Mhameed, S., Sharon, D., Kaufman, D. et al. 1997. Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and between *Persea* species. – *Theor. Appl. Genet.* 94: 279–286.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. – *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 70: 3321–3323.
- Nei, M. and Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. – *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 76: 5269–5273.

- Newett, S. D. E., Crane, J. H. and Balerdi, C. F. 2002. Cultivars and rootstocks. – In: Whiley, A. W., Schaffer, B. and Wolstenholme, B. N. (eds), *Avocado: botany, production and uses*. CAB Int.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I. et al. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. – *Mol. Ecol.* 4: 347–354.
- Schnell, R. J., Brown, J. S., Olano, C. T. et al. 2003. Evaluation of avocado germplasm using microsatellite markers. – *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 128: 881–889.
- Sharon, D., Cregan, P. B., Mhameed, S. et al. 1997. An integrated genetic linkage map of avocado. – *Theor. Appl. Genet.* 95: 911–921.
- Van de Peer, Y. and De Wachter, R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. – *Comput. Appl. Biosci.* 10: 569–570.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. – *Ann. Eugenics* 15: 323–354.
- Yeh, F. C., Young, R. C., Timothy, B. et al. 1997. Popgene, the user-friendly shareware for population genetic analysis. – *Mol. Biol. Biotech. Center, Univ. of Alberta, Canada.*

## **ANEXO 2.**

**Selection of potential pollinizers for 'Hass' avocado based on flowering time and male-female overlapping.**

Scientia Horticulturae (en prensa).





Contents lists available at ScienceDirect

Scientia Horticulturae

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/scihorti](http://www.elsevier.com/locate/scihorti)



## Selection of potential pollinizers for 'Hass' avocado based on flowering time and male–female overlapping

M.L. Alcaraz, J.I. Hormaza\*

Estación Experimental la Mayora – CSIC, 29760 Algarrobo-Costa, Málaga, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 November 2008  
Received in revised form 29 January 2009  
Accepted 4 February 2009

#### Keywords:

Bloom  
Dioecy  
Lauraceae  
*Persea americana*  
Pollination

### ABSTRACT

Avocado production is dependent on the singular synchronous protogynous dichogamy of the species that promotes outcrossing. With the objective of selecting potential pollinizer avocado genotypes for 'Hass', the most important avocado cultivar worldwide, we have monitored during two consecutive years the flowering phenology of 27 avocado genotypes in South-eastern Spain. The average length of the flowering season was 45 days ranging from 18 days for 'Harvest' to 50 days for 'Fuerte'. The earliest genotypes to flower were 'Fuerte' and 'Shepard' that started blooming during the third week of March. The latest genotypes to flower were 'Colin V-33', 'Adi', 'OA184' and 'Harvest', which started blooming in the second week of April. 'Hass' blooming lasted 30 days, from the first week of April until the second week of May. Since a good pollinizer must present not only an overlapping in the flowering season but also an overlapping in sexual stages with the pollinated cultivar, a group of 12 genotypes ('Hass', 'Fuerte' and 10 genotypes producing 'Hass-like' fruit with good overlapping in the flowering season with 'Hass') was studied with more detail determining daily the stages of male and female overlapping every 2 h. Results herein indicate that 'Marvel' and 'Nobel' showed a high sexual overlapping with 'Hass'. Taking into account the flowering phenology, the overlapping in sexual stages and the fruit set obtained with hand-pollinated flowers in the field, those two genotypes could be an interesting alternative to the current use of 'Fuerte' as pollinizer for 'Hass' in South-eastern Spain.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Avocado (*Persea americana* Mill.) is an evergreen subtropical fruit tree native to Central America and Mexico where it was domesticated and cultivated from ancient times (Galindo-Tovar et al., 2008; Chen et al., 2009). It is a member of the Lauraceae, a mostly subtropical or tropical family included in the basal angiosperm clade Magnoliid within the order Laurales. Several well-defined geographical ecotypes or botanical varieties of avocado adapted to different environmental conditions have been described of which three are considered of horticultural interest: Mexican [*P. americana* var. *drymifolia* (Schlecht. & Cham.) Blake], Guatemalan (*P. americana* var. *guatemalensis* L. Wms.) and West Indian (*P. americana* var. *americana* Mill.). These botanical varieties are distinguishable on the basis of morphological, physiological and horticultural traits (Bergh, 1995; Bergh and Lahav, 1996; Chanderbali et al., 2008). Thus, while Mexican and Guatemalan races are adapted to cooler climates, the West Indian race requires a warmer climate for optimum development. Most commercial avocado cultivars are interracial hybrids developed from chance

seedlings. The most widely grown cultivar worldwide is 'Hass', a black-skinned Guatemalan × Mexican hybrid.

Total world avocado production has reached more than 3.3 million tons in 2007, with a few countries (Mexico, Indonesia, USA, Colombia, Brazil, Chile, Dominican Republic and Peru) accounting for more than 70% of that production with Mexico being the main avocado producing country with more than 1 million tons and 30% of total world production (FAOSTAT, 2008). Spain is a singular case in avocado cultivation since it is the only European country with a significant commercial production (about 85,000 tons in 2007, FAOSTAT, 2008) limited to the Southern Mediterranean coast of Andalucía and the Canary Islands.

Avocado has a synchronous protogynous dichogamous breeding system that promotes outcrossing. Each perfect flower opens twice, the first functionally as a female flower with a white receptive stigma; then the flower closes and the following day the flower reopens functionally as a male flower with the stigmas no longer receptive and dehisced anthers (Davenport, 1986). The different avocado cultivars are classified in two groups (A or B) based upon their flowering behaviour (Nirody, 1922). In the type A cultivars, the flowers open in the morning in the female stage, close at mid-day and reopen the afternoon of the following day at the male stage. In the type B cultivars, the flowers open in the afternoon at the female stage, close in the evening and reopen the

\* Corresponding author. Tel.: +34 952 548 990; fax: +34 952 552 677.  
E-mail address: [ihormaza@elm.csic.es](mailto:ihormaza@elm.csic.es) (J.I. Hormaza).

following morning at the male stage (Stout, 1923). The combination of protogynous dichogamy and the flowering behaviour of the avocado prevents self-pollination promoting outcrossing. However, self-pollination occurs in orchards composed of a single genotype probably due to some overlapping between the male and female stages in the same flower, among flowers of the same tree or among flowers of different trees of the same genotype (Davenport, 1986).

A general problem of commercial avocado fruit production is the excessive flower and fruit abscission; thus, final fruit set can range from 0.001% to 0.23% (Sedgley, 1980) and a yield of 300 fruits per tree can be considered as a good production (Lahav and Zamet, 1999). Under optimum conditions, the floral behaviour is predictable. However, the flower opening cycle is sensitive to environmental conditions, mainly temperature (Lesley and Bringham, 1951; Sedgley, 1977; Sedgley and Annels, 1981; Ish-Am and Eisikowitch, 1991). The sensitivity of the flowering behaviour to environmental factors depends on the cultivar, and, in general, type B cultivars are more sensitive than type A cultivars to low temperatures (Sedgley and Grant, 1983).

In spite of the high percentage of self-pollinations reported in different environmental conditions (Davenport, 1989; Davenport et al., 1994), molecular studies of the genetic composition of the progeny obtained indicate that most of the final fruits are the result of outcrossing (Vrecenar-Gadus and Ellstrand, 1985; Degani et al., 1986, 1989, 1997, 2003; Goldring et al., 1987; Robbertse et al., 1997; Chen et al., 2007; Borrone et al., 2008). Thus, traditionally it has been considered that interplanting complementary cultivars in close proximity significantly increases yield in avocado (Bergh and Garber, 1964; Vrecenar-Gadus and Ellstrand, 1985; Degani et al., 1997) although the relative impact of outcrossing in final yield is still under debate (Garner et al., 2008).

Consequently, the existing evidence suggests that interplanting cultivars of opposite flowering types can be important to secure a good crop. However, depending on the yield and final market price of the fruit of the pollinating cultivar, profitability of the production can be reduced. The most important commercial cultivar in Spain, as in most avocado producing countries, is 'Hass' with 75% of the avocado production and 'Fuerte' is the most commonly cultivar used as pollen donor. However, 'Fuerte' is currently of less commercial interest than 'Hass', and the search for new pollinizers producing 'Hass-like' fruit can be advantageous. With the objective of selecting potential pollinizers for 'Hass', in this work the flowering phenology and daily flowering cycle of the most promising genotypes conserved in our germplasm collection is characterized under the environmental conditions of South-eastern Spain. Furthermore, those genotypes that present sufficient overlapping in the blooming period with 'Hass' and produce 'Hass-like' fruit are characterized with more detail. Finally, the effect of three potential pollinizers on fruit set is analyzed under field conditions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Climatic conditions

In continental Spain, avocados are grown in the Southern Andalusian coast (provinces of Malaga and Granada). Data at the E.E. la Mayora (36°45'N) for the last 45 years show an annual average of the mean temperatures of 19.4 °C with an average of 29.4 °C of the high temperatures in the hottest month (August) and an average of 9.3 °C of the low temperatures in the coolest month (January) with an annual rainfall of 435 mm.

### 2.2. Plant material and flowering period

This work was carried out on 27 avocado genotypes conserved in the avocado collection at the E.E. La Mayora (Málaga, Spain) comprising genotypes of both A and B types (Table 1).

During 2005 and 2006, the length of the flowering period, defined as the number of days between opening of the first flowers and closing of the last flowers, was established in at least two trees of the 27 avocado genotypes studied. Full bloom was estimated when more than 50% of the flower buds had opened.

### 2.3. Daily flowering cycle

The flowering cycle was studied daily in two trees of 12 genotypes: 'Hass', 'Fuerte' and 10 genotypes that produce 'Hass-like' fruit and show a high overlapping in blooming period with 'Hass' ('Gem 3-29-5', 'H670', 'Hass Motril', 'Jimenez 1', 'Jimenez 2', 'Lamb Hass', 'Lohneiss', 'Marvel', 'Nobel' and 'Tacambaro') in order to compare the overlapping between the male phase of these putative pollinizers and the female phase of 'Hass'. Every 2 h from 8:00 to 20:00 the flowering behaviour of each genotype was observed counting the flowers in male and female stage in 10 inflorescences located in different positions in the trees.

Moreover, to study the normal cycle of dichogamy under our environmental conditions in 'Hass' and three type B genotypes ('Marvel', 'Nobel' and 'Fuerte') a total of 20 flowers (10 per tree) were labelled daily during the blooming period and the day of the first opening was noted. These flowers were monitored until the second flower opening.

### 2.4. Pollinizer efficiency under field conditions

Hand-pollinations were carried out to compare the effect of three pollen sources on fruit set of 'Hass'. The three pollen donors selected in this study were: 'Nobel' and 'Marvel' (selected due to the results obtained during the monitoring of the flowering cycle) and 'Fuerte' (the most common cultivar used as pollen donor in Southern Spain). A total of 500 inflorescences distributed in 25 'Hass' trees were hand-pollinated. Three flowers were pollinated in each inflorescence using a different pollen donor for each one. Male flowers were collected at 12:00 and the pollen was immediately applied on the stigma of 'Hass' female flowers by direct contact of

**Table 1**

List of the 27 avocado varieties studied to determine the blooming phenology. Superscripts indicate the reference where the flower group was studied.

Genotype	Flower group	Genotype	Flower group
5-552	B <sup>d</sup>	Lamb Hass (BL122)	A <sup>a</sup>
Adi	A <sup>b</sup>	Lohneiss	A <sup>a</sup>
Colin v-33	B <sup>b</sup>	Marvel (BL516)	B <sup>b</sup>
Eden	A <sup>c</sup>	Negra de la Cruz	B <sup>b</sup>
Fuerte	B <sup>a</sup>	Nobel (BL667)	B <sup>b</sup>
Fundacion II	A <sup>a</sup>	OA184	B <sup>g</sup>
H670	A <sup>a</sup>	Pinkerton	A <sup>b</sup>
Gem (3-29-5)	A <sup>b</sup>	Regal	A <sup>e</sup>
Harvest	A <sup>d</sup>	Rincoatl	A <sup>b</sup>
Hass	A <sup>a</sup>	Rt 5176	B <sup>e</sup>
Hass Motril	A <sup>a</sup>	Shepard	B <sup>f</sup>
Iriet	B <sup>b</sup>	Sir Prize	B <sup>b</sup>
Jimenez 1	A <sup>a</sup>	Tacambaro	A <sup>a</sup>
Jimenez 2	A <sup>a</sup>		

<sup>a</sup> This work.

<sup>b</sup> <http://www.ucavo.ucr.edu>.

<sup>c</sup> Lavi et al. (1997).

<sup>d</sup> Arpaia et al. (2005).

<sup>e</sup> Martin and Bergh (1993).

<sup>f</sup> Newett et al. (2002).

<sup>g</sup> Witney and Martin (1995).

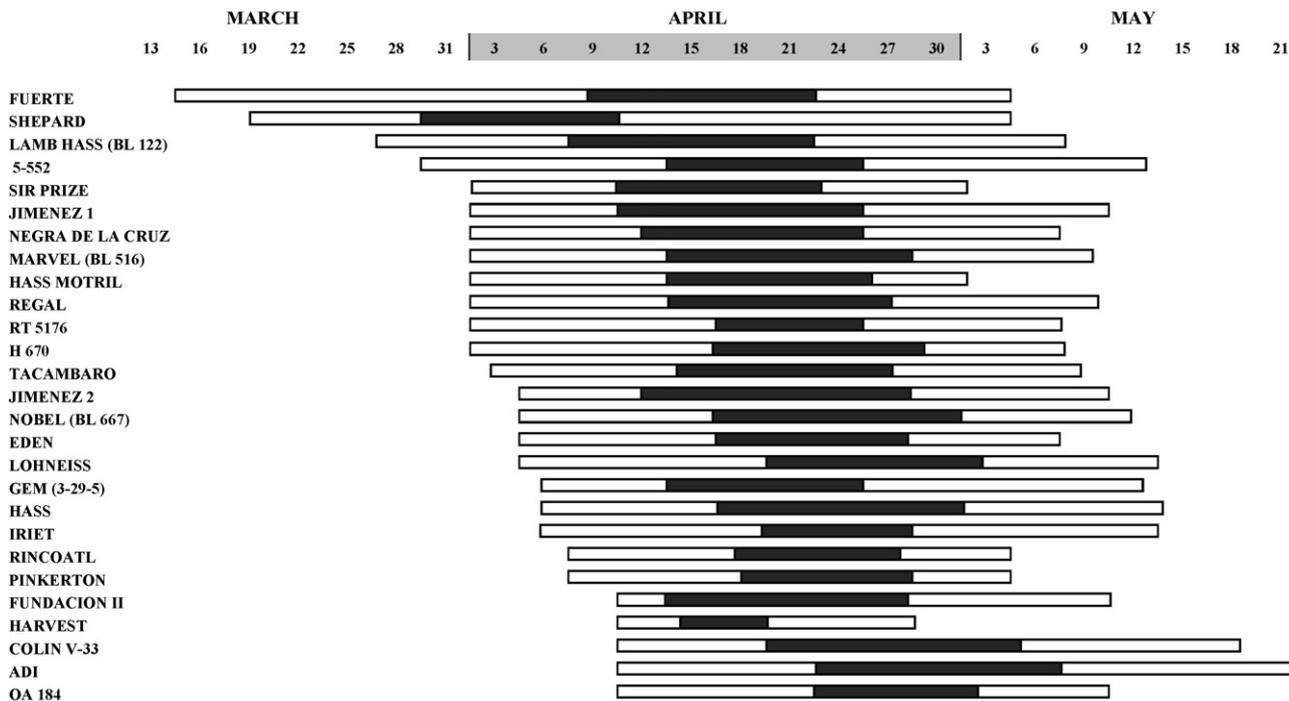


Fig. 1. Diagram of flowering of the 27 avocado genotypes studied in this work. Full bloom is showed in dark colour. Data are mean values of two years observations.

the anthers with the stigma. The rest of the non-pollinated flowers in the inflorescences were removed. The number of flowers and developing fruits retained by the trees were monitored weekly, the abscission date was noted and the final fruit set was calculated. Proportion comparisons were analyzed using Yates' chi-square goodness-of-fittest in 2 × 2 contingency tables testing for association between pollen donor genotypes and fruit set. The SPSS package v 15 (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for all statistical analyses.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Flowering phenology

The study of flowering phenology during two consecutive years showed that the length of the blooming period in the genotypes studied ranged from 18 days in 'Harvest' to 50 days in 'Fuerte' and full bloom varied from one to two weeks in most genotypes (Fig. 1). The length of the blooming period for each genotype was similar during the two years studied, although in 2006 the beginning of flowering occurred one week earlier than in 2005. We could distinguish several early flowering genotypes ('Fuerte', 'Shepard' and 'Lamb Hass'), whose flowers start opening in March, and late flowering genotypes ('Harvest', 'Colin V-33', 'Fundacion II', 'OA184' or 'Adi'), whose flowers start opening at mid-April.

Full bloom for most genotypes occurred during April, displaying a good overlapping with 'Hass' (Fig. 1). However, full bloom of 'Fuerte', the most commonly used pollinizer for 'Hass' in Spain, only showed a good overlapping with 'Hass' during the first half of 'Hass' full bloom; consequently it will be of interest to find additional pollinizers for the second half of the 'Hass' flowering period.

#### 3.2. Daily flowering cycle

The daily flowering cycle has been monitored in 'Hass', 'Fuerte', and in 10 'Hass-like' genotypes in order to study possible complementation between flower stages. Although avocado has

been described as a species with a marked protogynous dichogamy, it is common to observe flowers in different sexual stages at the same time among trees of the same genotype and even within the same tree. This overlapping is more extense at the start and at the end of the flowering season and this may help to explain fruit production in single cultivar blocks (Davenport, 1989; Davenport et al., 1994). Thus, although dichogamy enhances the opportunity of cross-fertilization and, hence, is a mechanism that reduces inbreeding, the overlapping between flowers in both male and female stages can be considered as a bet-hedging strategy to ensure fertilization and seed production when the opportunities for outcrossing are limited.

During the period of full bloom, the flowers of the type B genotypes studied ('Fuerte', 'Nobel' and 'Marvel') opened in the male stage between 8:00 and 10:00 (Fig. 2). At 12:00, the anthers

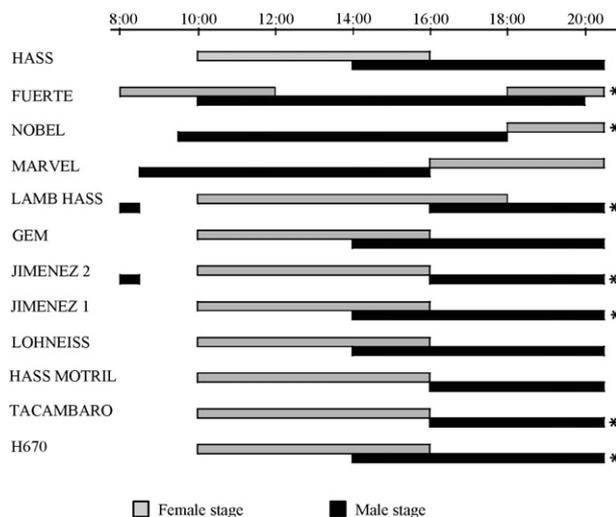


Fig. 2. Daily sexual stage of flowers of different genotypes with 'Hass-like' fruit during the full bloom period. Data are mean values of two years observations. \*Flowers remain open after the last monitoring.

became dehiscent. Previous works have described that 'Fuerte' shows a high overlapping between the female and male stages within the same inflorescence (Nirody, 1922). This is also the case in this work, where 'Fuerte' showed a high overlapping between male and female flowers in the same trees from 10:00 to 12:00 and from 18:00 to 20:00, whereas no overlapping was observed in both 'Nobel' and 'Marvel'. Male flowers closed in the afternoon and female flowers closed in the evening except in the case of 'Fuerte' whose flowers opened in the female stage later and many of them continued open during the early hours of the following morning where it was common to observe overlapping between male and female flowers. During the period of full bloom, flowers of the type A genotypes studied ('Hass', 'Lamb Hass', 'Gem', 'Jimenez 1', 'Jimenez 2', 'Hass Motril', 'Lohneiss', 'Tacambaro' and 'H 670') opened as females at 10:00 and remained open until 16:00 (18:00 in the case of 'Gem'). Overlapping between closing female flowers and opening male flowers occurred in 'Hass', 'Gem', 'Jimenez 1', 'Lohneiss' and 'H670' between 14:00 and 16:00; in 'Lamb Hass' the overlapping took place between 16:00 and 18:00 whereas no overlapping was observed in 'Jimenez 2', 'Hass Motril' or 'Tacambaro', except at the end of the flowering season.

'Hass' flowering revealed a wide variation in floral behaviour at the beginning and at the end of the blooming season. Thus, at the beginning of the blooming season, flowers opened at the female stage at 10:00 and closed at 16:00 whereas they opened at the male stage at 14:00 and remained in that stage overnight beginning to close between 10:00 and 12:00. In this period, overlapping between the male and female stages could be found during 4 h: 10:00–12:00 and 14:00–16:00. When compared with 'Hass', 'Marvel' had a similar blooming season and an overlapping with 'Hass' flowers could be observed during the first morning hours, although anther dehiscence took place at 12:00. At the end of the blooming period, type A genotypes showed a reduction in the length of the floral cycle, the female flowers opened approximately at 12:00 and the male flowers closed before 20:00.

On the other hand, while type A genotypes showed a similar behaviour to that described for the first time by Nirody (1922), the floral cycle of type B genotypes, under our growing conditions, did not follow the normal cycle described in previous reports. Thus, flowers opened at the female stage in the evening; most of them remained open briefly the following morning overlapping with the male flowers that opened for the first time at the female stage two days earlier. A similar behaviour was described by Lesley and Bringhurst (1951) since the flowers did not open in the female stage under conditions where the maximum day temperatures ranged between 18 °C and 21 °C and night temperatures ranged between 7 °C and 12 °C. Under our growing conditions in April, maximum day temperatures ranged from 17.5 °C to 27.5 °C in 2005 and from 18.5 °C to 25.5 °C in 2006 (with an average of 21.6 °C and 21.4 °C respectively) whereas minimum night temperatures ranged from 9 °C to 17.5 °C in 2005 and from 11 °C to 16.5 °C in 2006 (with an average of 12.8 °C and 13.6 °C respectively). Thus, our results corroborate the higher sensibility of type B genotypes to low temperatures reported previously (Lesley and Bringhurst, 1951; Sedgley, 1977; Sedgley and Annels, 1981; Sedgley and Grant, 1983).

The cycle described above was observed under normal conditions in the blooming season. However, during this period, a few cloudy days resulting in lower temperatures were observed ranging from 4 days in 2005 to 7 in 2006. In these days, characterized by a decrease on day and night temperatures, the floral behaviour was altered. Thus, under cooler conditions, 'Hass' flowers showed a delay of their regular floral cycle; female flowers opened at mid-day and closed around 18:00; male flowers opened at night and remained open until mid-day (data not shown). Thus, the second flower opening took place the third day after the first opening. Under those conditions, flowers of type B cultivars usually

opened at the female stage in the evening and, while some of them closed during the night, others remained open during the morning overlapping with the male flowers that opened for the first time at the female stage three days earlier. The female flowers reopened the fourth day in the morning as male flowers. Similar observations on the alteration of the flower cycle have been reported previously (Stout, 1923; Robinson, 1931; Lesley and Bringhurst, 1951; Papademetriou, 1976; Sedgley, 1987).

### 3.3. Differences in final fruit set

Significant differences were obtained in fruit set following hand pollination with the three selected pollinizers. Thus, final fruit set was 2.8%, 7.4% and 8.4% for 'Fuerte', 'Marvel' and 'Nobel' respectively. No significant differences were found between 'Marvel' and 'Nobel' ( $P = 0.558$ ), whereas significant differences were obtained between 'Fuerte' and 'Nobel' ( $P < 0.001$ ) and 'Marvel' ( $P = 0.001$ ). Taking into account these results and the results discussed above on the overlapping in the flowering cycle, it seems that 'Fuerte' is less efficient than the other two pollinizers for 'Hass' under our growing conditions. Different factors such as differences in pollen vigor or differential pollen tube growth during the progamic phase and/or differential embryo abortion at the post-zygotic level could be responsible of these differences.

## 4. Conclusion

Pollination is considered as a limiting factor for optimal yield production in commercial avocado orchards (Vithanage, 1990; Ish-Am and Eisikowitch, 1991). Taking into account the flowering phenology, the overlap in sexual stages and the fruit set obtained with hand-pollinated flowers in the field, an alternative to the current use of 'Fuerte' as main pollinizer in the avocado orchards in Southern Spain could be to combine some 'Fuerte' trees which will guarantee the pollination during the first two weeks of the flowering of 'Hass', with other type B genotypes such as 'Nobel' and/or 'Marvel'. This mixed plantation system of two or more genotypes would have the advantage of decreasing the possible negative effect of a lack of synchrony between two genotypes depending on the environmental conditions. A similar approach could be used in other avocado growing regions to optimize 'Hass' cross-pollination.

## Acknowledgements

Financial support for this work was provided by the Spanish Ministry of Education (Project Grant AGL2007-60130/AGR) and Junta de Andalucía (Project Grant P08-AGR-3694). M.L.A. was supported by an I3P doctoral grant of CSIC. We gratefully acknowledge J.M. Hermoso for valuable information on phenotypic characteristic of avocado genotypes used in this study and J. Rodrigo and A. Hedhly for helpful comments on the manuscript.

## References

- Arpaia, M.L., Stottlemeyer, D., Bates, L.M., Focht, E., 2005. The California cross pollination experiment—a progress report on the influence of pollinizer variety and proximity of 'Hass' yield. In: New Zealand and Australia Avocado Growers' Conferencé05, Tauranga, New Zealand. Session 7. Flowering, fruit set and yield, p. 9.
- Bergh, B.O., 1995. Avocado. In: Smartt, J., Simmonds, N.W. (Eds.), *Evolution of Crop Plants*. Longman Scientific & Technical, Harlow, UK, pp. 240–245.
- Bergh, B.O., Garber, M.J., 1964. Avocado yields increased by interplanting different varieties. *California Avocado Soc. Yrbk.* 48, 78–85.
- Bergh, B.O., Lahav, E., 1996. Avocados. In: Janick, J., Moore, J.N. (Eds.), *Fruit Breeding*, vol. 1: Tree and Tropical Fruits. John Wiley and Sons, New York, pp. 113–166.
- Borrone, J.W., Tondo, C.T., Kuhn, D.N., Brown, J.S., Schnell, R.J., Violi, H.A., 2008. Out-crossing in Florida avocados as measured using microsatellite markers. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 133 (2), 255–261.

- Chanderbali, A.S., Albert, V.A., Ashworth, V.E.T.M., Clegg, M.T., Litz, R.E., Soltis, D.E., Soltis, P.S., 2008. *Persea americana* (avocado): bringing ancient flowers to fruit in the genomics era. *Bioessays* 30, 386–396.
- Chen, H., Ashworth, V.E.T.M., Xu, S., Clegg, M.T., 2007. Quantitative genetic analysis of growth rate in avocado. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 132, 691–696.
- Chen, H., Morrell, P.L., Ashworth, V.E.T.M., de la Cruz, M., Clegg, M.T., 2009. Tracing the geographic origins of major avocado cultivars. *J. Heredity* 100, 56–65.
- Davenport, T.L., 1986. Avocado flowering. *Hortic. Rev.* 8, 257–289.
- Davenport, T.L., 1989. Pollen deposition on avocado stigma in Southern Florida. *HortScience* 24, 844–845.
- Davenport, T.L., Parnitzki, P., Fricke, S., Hughes, M.S., 1994. Evidence and significance of self-pollination of avocado in Florida. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 119 (6), 1200–1207.
- Degani, C., Goldring, A., Gazit, S., Lavi, U., 1986. Genetic selection during the abscission of avocado fruitlets. *HortScience* 21, 1187–1188.
- Degani, C., Goldring, A., Gazit, S., Lavi, U., 1989. Pollen parent effect on outcrossing rate in 'Hass' and 'Fuerte' avocado plots during fruit development. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 114, 106–111.
- Degani, C., El-Batsri, R., Gazit, S., 1997. Outcrossing rate, yield and selective fruit abscission in 'Ettinger' and 'Ardith' avocado plots. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 122, 813–817.
- Degani, C., Lahav, E., El-Batsri, R., 2003. Caging single avocado trees beehive does not guarantee exclusive formation of selfed progeny. *HortScience* 38 (7), 1433–1434.
- FAOSTAT, 2008. FAO online database. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> (accessed 11.11.2008).
- Galindo-Tovar, M.E., Ogata-Aguilar, N., Arzate-Fernandez, A.M., 2008. Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. *Gen. Res. Crop Evol.* 55, 441–450.
- Garner, L.C., Ashworth, V.E.T.M., Clegg, M.T., Lovatt, C.J., 2008. The impact of outcrossing on yields of 'Hass' avocado. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 133, 631–722.
- Goldring, A., Gazit, S., Degani, C., 1987. Isozyme analysis of mature avocado embryos to determine outcrossing rate in a 'Hass' plot. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 112, 380–392.
- Ish-Am, G., Eisikowitch, D., 1991. New insight into avocado flowering in relation to its pollination. *California Avocado Soc. Yrbk.* 75, 125–137.
- Lahav, E., Zamet, D.N., 1999. Flower, fruitlets and fruit drop in avocado trees. *Revista Chapingo Serie Horticul.* 5, 95–100.
- Lavi, U., Sharon, D., Kaufman, D., Saada, D., Chapnik, A., Zamet, D.N., Degani, C., Lahav, E., Shmuel, G., 1997. 'Eden'—a new Avocado cultivar. *HortScience* 32 (1), 151.
- Lesley, J.W., Bringham, R.S., 1951. Environmental conditions affecting pollination of avocados. *California Avocado Soc. Yrbk.* 36, 169–173.
- Martin, G., Bergh, B., 1993. Avocado Breeding. In: *Proceedings of the California Avocado Research Symposium*. pp. 2–4.
- Newett, S.D.E., Crane, J.H., Balerdi, C.F., 2002. Cultivars and rootstocks. In: *Whiley, A.W., Schaffer, B., Wolstenholme, B.N. (Eds.), Avocado: Botany, Production and Uses*. CAB International, Wallingford, UK.
- Nirody, B.S., 1922. Investigations in avocado breeding. *Calif. Avoc. Assoc. Ann. Report* 65–78.
- Papademetriou, M.K., 1976. Some aspects of the flower behaviour, pollination and fruit set of avocado (*Persea americana* Mill.) in Trinidad. *California Avocado Soc. Yrbk.* 59, 106–152.
- Robbertse, P.J., Johannsmeier, M.F., Morudu, T.M., 1997. Pollination of Hass avocado. *S. Afr. Avocado Growers' Assoc. Yrbk.* 20, 84–85.
- Robinson, T., 1931. Some aberrant forms of flower mechanism in the avocado. *California Avocado Soc. Yrbk.* 15, 174–179.
- Sedgley, M., 1977. The effect of temperature on floral behaviour, pollen tube growth and fruit set in the avocado. *J. Hortic. Sci.* 52, 135–141.
- Sedgley, M., 1980. Anatomical investigation of abscised avocado flowers and fruitlets. *Ann. Bot.* 46, 771–777.
- Sedgley, M., 1987. Flowering, pollination and fruit set of avocado. *S. Afr. Avocado Growers' Assoc. Yrbk.* 10, 42–43.
- Sedgley, M., Annels, C.M., 1981. Flowering and fruit-set response to temperatures during flowering on floral cycle and pollen tube growth in nine avocado cultivars. *Sci. Hortic.* 18, 207–213.
- Sedgley, M., Grant, W.J.R., 1983. Effect of low temperatures during flowering on floral cycles and pollen tube growth in nine avocado cultivars. *Sci. Hortic.* 18, 207–213.
- Stout, A.B., 1923. A study in cross-pollination of avocado in southern California. *Calif. Avoc. Assoc. Ann. Report* 8, 29–45.
- Vithanage, V., 1990. The role of the European honeybees (*Apis mellifera* L.) in avocado pollination. *J. Hortic. Sci.* 65, 81–86.
- Vrecenar-Gadus, M., Ellstrand, N.C., 1985. The effect of planting design on outcrossing rate and yield in the 'Hass' avocado. *Sci. Hortic.* 27, 215–221.
- Witney, G., Martin, G., 1995. Taking the California Avocado breeding program into the next century. *Proceedings of the III World Avocado Congress* 114–118.





