

UNIVERSIDAD POLITECNICA DE MADRID
ESCUELA TECNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRONOMOS

TESIS DOCTORAL

CALIDAD DE FLOR Y CUAJADO DE FRUTO
EN ALBARICOQUERO (*Prunus armeniaca* L.) cv MONIQUI

JAVIER RODRIGO GARCIA
Ingeniero Agrónomo

1997

**DEPARTAMENTO DE PRODUCCION VEGETAL: FITOTECNIA
UNIVERSIDAD POLITECNICA DE MADRID**

TESIS DOCTORAL

**CALIDAD DE FLOR Y CUAJADO DE FRUTO
EN ALBARICOQUERO (*Prunus armeniaca* L.) cv MONIQUI**

JAVIER RODRIGO GARCIA

**Ingeniero Agrónomo
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos**

Madrid, Diciembre de 1996

**CERTIFICACION
DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL**

Dña María Herrero Romero, Dra en Ciencias Biológicas, Investigadora de la Unidad de Fruticultura, Servicio de Investigación Agroalimentaria de la Diputación General de Aragón

C E R T I F I C A :

Que, la Tesis Doctoral que lleva por título "**Calidad de flor y cuajado de fruto en albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) cv Moniquí**", de la que es autor el Ingeniero Agrónomo

D Javier Rodrigo García

ha sido realizada íntegramente bajo mi dirección, en la Unidad de Fruticultura del Servicio de Investigación Agroalimentaria (D G A) de Zaragoza durante el período comprendido entre los meses de Febrero de 1993 y Diciembre de 1996.

Considerando que se trata de un trabajo original de investigación que reúne todos los requisitos establecidos en el RD 185/1985 (BOE: 23 02.85), autorizo su presentación

En Zaragoza, a _____ de _____ de 19 __

Fdo María Herrero Romero

VºBº
El Catedrático - Tutor

Fdo D Fernando Gil-Albert Velarde

A Dolores

AGRADECIMIENTOS

A la Dra María Herrero, por su insuperable labor de dirección Trabajar con ella ha sido un lujo; compartir estos cuatro años, un auténtico placer.

Al Dr. Fernando Gil-Albert Velarde, tutor de esta tesis, por su ayuda y sabios consejos.

Al Servicio de Investigación Agroalimentaria de la DGA y la Unidad de Fruticultura, donde se ha llevado a cabo este trabajo.

Al Departamento de Pomología de la Estación Experimental de Aula Dei, por las facilidades en la realización de ensayos en su colección de variedades

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de la beca que alivió los problemas financieros

Al Dr José Ignacio Hormaza, por el empeño mostrado en mi adiestramiento, sus insustituibles comentarios en el desarrollo y redacción de esta tesis, y su inagotable afán de buscar defectos Y lo que es peor, encontrarlos.

A la Dra Pilar Errea, por su ayuda continua desde el primer día, incluyendo el período que invirtió en traernos a Fermín, futuro becario

A Amalia Escota y Reyes López, por darme auxilio en tantos momentos de cierzo, abejas, barro, heladas y golpes de calor Y de laboratorio, por supuesto

A los integrantes de la Unidad de Fruticultura al completo, que se han volcado en todo momento, y a todos los compañeros que a lo largo de este tiempo han ido circulando por la transitada sala de becarios

A Eliseo Rivas, por compartir sufrimientos en la doma del analizador de imagen y por su inestimable colaboración a la hora de elaborar los programas informáticos.

A Ignacio Susín, por lograr sacarme de diversos atolladeros informáticos y por su contribución en la ardua tarea de dar sentido a mis números

A Antonio Berdejo, por facilitar la realización de ensayos en su preciosa plantación

Y especialmente a mis amigos Margarita, Iñaki y Pilar, que me han acompañado en tantas jornadas nocturnas de reflexión.

INDICE



1 INTRODUCCION GENERAL	1
1.1 EL ALBARICOQUERO	1
1.1.1. Características botánicas	1
1.1.2. Origen del cultivo	2
1.1.3. Exigencias climáticas	2
1.1.4. Material vegetal	3
1.1.4.1. Cultivares	3
1.1.4.2. Patrones	4
1.1.5. Situación del cultivo	6
1.2. BIOLOGIA FLORAL	9
1.2.1. Inducción y diferenciación floral	9
1.2.2. Anatomía de la flor	10
1.2.3. De polinización a fecundación	11
1.2.3.1. Estigma	12
1.2.3.2. Estilo	13
1.2.3.3. Ovario	13
1.2.4. Incompatibilidad polen-pistilo	15
1.3. FRUCTIFICACION	17
1.3.1. Cuajado de frutos	17
1.3.2. Crecimiento del fruto	18
1.3.3. Caída de frutos	19
1.4. FOTOASIMILADOS Y RESERVAS	20
1.4.1. Las reservas en las plantas leñosas	20
1.4.2. Reservas y fructificación	21
1.4.3. Reservas en la flor y calidad de flor	21
1.5. CONCLUSIONES DE LA REVISION	23
1.6. OBJETIVOS	24

2 DIFERENCIACION FLORAL EN ALBARICOQUERO	25
2.1 INTRODUCCION	25
2.2 MATERIAL Y METODOS	26
2.2.1. Material vegetal	26
2.2.2. Fenología de la diferenciación floral	26
2.2.3. Fenología de la floración	27
2.3 RESULTADOS	29
2.4 DISCUSION	38
3 DE POLINIZACION A FECUNDACION EN ALBARICOQUERO	40
3.1. INTRODUCCION	40
3.2. MATERIAL Y METODOS	41
3.2.1. Material vegetal	41
3.2.2. Preparación del material	41
3.2.2.1. Establecimiento de poblaciones de flores	41
3.2.2.2. Obtención de polen	41
3.2.2.3. Emasculación y polinización de las flores	41
3.2.3. Técnicas para el estudio de la germinación y crecimiento de los tubos polínicos	42
3.2.4. Técnicas histológicas	45
3.2.4.1. Fijación e inclusión del material	45
3.2.4.2. Obtención de cortes	46
3.2.4.3. Tinción de los cortes	46
3.3. RESULTADOS	50
3.4. DISCUSION	59

4 LA POLINIZACION COMO CONDICIONANTE DEL CUAJADO EN ALBARICOQUERO cv MONIQUI	61
4.1. INTRODUCCION	61
4.2. MATERIAL Y METODOS	62
4.2.1. Polinizaciones en laboratorio	62
4.2.2. Ensayo de polinización suplementaria	63
4.2.3. Preparación del material para el microscopio	63
4.3. RESULTADOS	64
4.3.1. Polinizaciones en laboratorio	64
4.3.2. Ensayo de polinización suplementaria	66
4.4. DISCUSION	69
4.4.1. Compatibilidad polen-pistilo	69
4.4.2. Efecto de la polinización en el cuajado de frutos	70
5 FRUCTIFICACION: CAIDA Y CRECIMIENTO DE FRUTOS	72
5.1. INTRODUCCION	72
5.2. MATERIAL Y METODOS	73
5.2.1. Material vegetal	73
5.2.2. Preparación del material	73
5.2.2.1. Establecimiento de poblaciones de flores	73
5.2.2.2. Conteo de flores y frutos para el control de la caída	74
5.2.2.3. Recogida de flores y frutos para el control del crecimiento	74
5.3. RESULTADOS	75
5.3.1. Caída de flores y frutos	75
5.3.2. Crecimiento del ovario	81
5.4. DISCUSION	86

6. EVALUACION DEL CONTENIDO DE ALMIDON MEDIANTE ANALISIS DE IMAGEN	89
6.1 INTRODUCCION	89
6.2 MATERIALES Y METODOS	90
6.2.1. Preparación del material para el microscopio	90
6.2.2. Análisis de imagen	91
6.3. RESULTADOS Y DISCUSION	95
7. INFLUENCIA DE LAS RESERVAS DEL OVULO EN EL PROCESO REPRODUCTIVO	100
7.1. INTRODUCCION	100
7.2. MATERIAL Y METODOS	102
7.2.1. Preparación del material	102
7.2.2. Determinación del tamaño de los óvulos	102
7.2.3. Cuantificación del contenido de almidón del óvulo	103
7.2.4. Observación de la callosa en los óvulos	103
7.3. RESULTADOS	105
7.4. DISCUSION	114
7.4.1. El almidón como sustento del crecimiento del óvulo primario	114
7.4.2. El almidón en el proceso de degeneración del óvulo secundario	115
7.4.3. Teorías sobre la reducción del número de óvulos: rivalidad frente a altruismo	116
8. LAS RESERVAS DE LA FLOR COMO SUSTENTO DEL DESARROLLO INICIAL DEL FRUTO	118
8.1. INTRODUCCION	118
8.2. MATERIAL Y METODOS	119
8.2.1. Preparación del material	119
8.2.2. Determinación del tamaño del ovario	120
8.2.3. Cuantificación del contenido de almidón del pericarpio	120
8.2.4. Determinación del número de células y del tamaño celular	121
8.3. RESULTADOS	123
8.4. DISCUSION	129

9. DISCUSION GENERAL	132
9.1 INFLUENCIA DE LOS DIAS POSTERIORES A ANTESIS EN EL CUAJADO	132
9.2 RESERVAS DE LA FLOR, FECUNDACION Y FRUCTIFICACION	134
9.3 CALIDAD DE FLOR Y CUAJADO	136
10. CONCLUSIONES	138
11. REFERENCIAS	140
12. ANEJO: PROGRAMAS INFORMATICOS ELABORADOS PARA EL ANALIZADOR DE IMAGEN	153
12.1. EVALUACION DEL CONTENIDO DE ALMIDON	153
12.1.1 Calibrado del analizador de imagen	154
12.1.2. Medida de la densidad óptica	155
12.1.3. Calibrado de la densidad óptica	157
12.2 MEDIDA DEL TAMAÑO DE OVULOS	158
12.3. MEDIDA DEL TAMAÑO DE OVARIOS	160

INDICE DE FIGURAS

2 DIFERENCIACION FLORAL EN ALBARICOQUERO

2.1:	Estados fenológicos de la floración de albaricoquero	28
2.2:	Fenología del cultivar Moniquí desde la caída de hojas hasta la salida del reposo	32
2.3:	Fenología del cultivar Moniquí desde el desborre hasta el estado de botón globoso.	34
2.4:	Desarrollo del pistilo en el cultivar Moniquí	36
2.5:	Estados fenológicos de cultivares de albaricoquero durante el período 1993-1996 en la EE Aula Dei (Zaragoza)	37
2.6:	Período de floración medio de cultivares de albaricoquero durante el período 1993-1996 en la EE Aula Dei (Zaragoza)	37

3. DE POLINIZACION A FECUNDACION EN ALBARICOQUERO

3.1:	Preparación del material. Establecimiento de poblaciones de flores, emasculación y polinización en campo y en laboratorio	44
3.2:	Esquema del pistilo y del ovario de una flor de albaricoquero mostrando el camino recorrido por el tubo polínico	51
3.3:	Anatomía de la flor de albaricoquero	53
3.4:	Germinación y crecimiento de los tubos polínicos en el estilo en albaricoquero	55
3.5:	Crecimiento de los tubos polínicos en el estilo de 'Moniquí' y 'Búlida' en 1993	56
3.6:	Crecimiento de los tubos polínicos en el ovario de flores de 'Moniquí'	58

4. LA POLINIZACION COMO CONDICIONANTE DEL CUAJADO EN ALBARICOQUERO cv MONIQUI

4.1:	Crecimiento de los tubos polínicos en el estilo en el cruzamiento compatible 'Moniquí' x 'Canino' y en el autocruzamiento incompatible de 'Moniquí'	65
4.2:	Porcentaje de pistilos sin granos de polen en cruzamientos realizados en laboratorio con los cultivares 'Moniquí', 'Búlida', 'Paviot' y 'Canino'	67
4.3:	Presencia de granos de polen en el estigma en cruzamientos realizados en laboratorio con los cultivares 'Moniquí', 'Búlida', 'Paviot' y 'Canino'	67
4.4:	Porcentaje de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo a las 72 h de la polinización en cruzamientos realizados en laboratorio con los cultivares 'Moniquí', 'Búlida', 'Paviot' y 'Canino'	67
4.5:	Número medio de tubos polínicos en la base del estilo a las 72 h de la polinización en cruzamientos realizados en laboratorio con los cultivares 'Moniquí', 'Búlida', 'Paviot' y 'Canino'	67
4.6:	Cruzamientos compatibles (+) e incompatibles (-) entre los cultivares 'Moniquí', 'Búlida', 'Paviot' y 'Canino'	67
4.7:	Porcentaje de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo y número de tubos polínicos en la base del estilo a las 72 h de la polinización en 'Royal'	67
4.8:	Cuajado y tubos polínicos en la base del estilo en flores sobrepolinizadas y flores dejadas a polinización libre	68

5. FRUCTIFICACION: CAIDA Y CRECIMIENTO DE FRUTO

5.1:	Caída de flores sin polinizar, flores polinizadas artificialmente y flores de polinización libre, de 'Moniquí' en los años 1993 y 1994	76
5.2:	Caída de flores sin polinizar, flores polinizadas artificialmente y flores de polinización libre, de 'Búlida' en los años 1993 y 1994	77

5.3:	Caída relativa de flores sin polinizar, flores polinizadas artificialmente y flores de polinización libre de 'Moniquí' en los años 1993 y 1994	78
5.4:	Caída relativa de flores sin polinizar, flores polinizadas artificialmente y flores de polinización libre de 'Búlida' en los años 1993 y 1994	79
5.5:	Peso de frutos y porcentaje de cuajado de 'Moniquí' y 'Búlida' en 1993	80
5.6:	Peso de flores y frutos de 'Moniquí' en 1993 y 1994	82
5.7:	Peso de flores y frutos de 'Búlida' en 1993 y 1994	83
5.8:	Peso de flores y frutos de 'Moniquí' en flores polinizadas y sin polinizar en 1994	84
5.9:	Peso de flores y frutos de 'Búlida' en flores polinizadas y sin polinizar de 'Moniquí' en 1994	85
6	EVALUACION DEL CONTENIDO DE ALMIDON MEDIANTE ANALISIS DE IMAGEN	
6.1:	Diagramas de flujo de los programas utilizados en la evaluación del contenido de almidón	94
6.2:	Vistas de un óvulo a través del analizador de imagen	98
6.3:	Evaluación cuantitativa del contenido de almidón de 3 zonas de un óvulo expresado como densidad óptica y medido en 3 sesiones independientes	99
7	INFLUENCIA DE LAS RESERVAS DEL OVULO EN EL PROCESO REPRODUCTIVO	
7.1:	Diagrama de flujo del programa utilizado para la medida del tamaño de los óvulos	104
7.2:	Esquema de un óvulo de una flor de albaricoquero	104
7.3:	Desarrollo y degeneración de óvulos de flores de albaricoquero cv Moniquí: crecimiento, contenido de almidón y acumulación de callosa	108
7.4:	Crecimiento de óvulos en flores polinizadas y no polinizadas de albaricoquero cv Moniquí	109

7.5:	Contenido de almidón en el extremo micropilar de la nucela en flores polinizadas y no polinizadas de albaricoquero cv Moniquí	110
7.6:	Contenido de almidón en los tegumentos en flores polinizadas y no polinizadas de albaricoquero cv Moniquí	111
7.7:	Contenido de almidón en los tegumentos y crecimiento del óvulo primario en flores polinizadas y no polinizadas de albaricoquero cv Moniquí	112
7.8:	Contenido de almidón y acumulación de callosa en el óvulo secundario en flores polinizadas y no polinizadas de albaricoquero cv Moniquí	113

8 LAS RESERVAS DE LA FLOR COMO SUSTENTO DEL DESARROLLO INICIAL DEL FRUTO

8.1:	Diagrama de flujo del programa utilizado para la medida del tamaño del pericarpio	122
8.2:	Esquema del ovario de una flor de albaricoquero	122
8.3:	Contenido de almidón en el pericarpio de flores polinizadas y no polinizadas de albaricoquero cv Moniquí	124
8.4:	Peso de flores polinizadas y no polinizadas de albaricoquero cv Moniquí	125
8.5:	Tamaño del óvulo primario de flores polinizadas y no polinizadas de albaricoquero cv Moniquí	126
8.6:	Número de células en el pericarpio de flores polinizadas y no polinizadas de albaricoquero cv Moniquí	127
8.7:	Distribución de flores en antesis de albaricoquero cv Moniquí en función de su contenido de almidón	128

INDICE DE TABLAS

1 INTRODUCCION GENERAL

1.1.	Superficie cultivada, porcentaje sobre la superficie cultivada total y área de cultivo de los principales cultivares de albaricoquero cultivados en España	5
1.2.	Patrones para albaricoquero más utilizados en España	5
1.3.	Producción y porcentaje sobre la producción mundial de los principales países productores de albaricoques	8
1.4.	Producción y porcentaje sobre la producción total de las principales provincias productoras de albaricoques en España.	8

3. DE POLINIZACION A FECUNDACION EN ALBARICOQUERO

3.1:	Composición de la serie de alcohol butílico terciario (<i>TBA</i>) empleada para la deshidratación del material previa a su inclusión en parafina	47
3.2:	Proceso de deshidratación de material fijado en FAA para su posterior inclusión en parafina	47
3.3:	Proceso de deshidratación de material fijado en glutaraldehído para su posterior inclusión en resina sintética JB4.	48
3.4:	Proceso de hidratación de cortes de parafina a temperatura ambiente	48
3.5:	Composición, uso y aplicación empleada de distintas tinciones histoquímicas fluorescentes	49
3.6:	Composición, uso y aplicación empleada de distintas tinciones histoquímicas para luz normal	49

6 EVALUACION DEL CONTENIDO DE ALMIDON MEDIANTE ANALISIS DE IMAGEN

6.1.	Análisis de varianza, con dos factores de variación, de evaluaciones cuantitativas del contenido de almidón de tres regiones de un óvulo de albaricoquero	99
------	---	----

RESUMEN

Los cuajados erráticos se atribuyen a condiciones climáticas adversas, pero cuando éstas no los explican, se alude de modo empírico a algo intrínseco a la flor, que se ha denominado calidad de flor aunque se desconoce qué la determina. En este trabajo se estudia qué es la calidad de flor y se evalúa si puede estar asociada a las reservas de almidón acumuladas en la flor. Para ello se ha estudiado la biología floral en albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) y sus implicaciones en el cuajado de fruto en el cultivar Moniquí, prestando especial atención a cómo las reservas de almidón acumuladas en la flor condicionan el cuajado. En primer lugar, se ha caracterizado el desarrollo de la yema floral y la fase comprendida entre la polinización y la fecundación, y se ha establecido en campo los patrones de crecimiento y caída de frutos. Una vez fijado este marco, se ha examinado qué es la calidad de flor, valorando el impacto que tiene el contenido de almidón de la flor tanto en el éxito reproductivo como en la fructificación.

El desarrollo del pistilo y, sobre todo, la mayor parte del crecimiento de los óvulos tiene lugar después del desborre. Tras la polinización, los tubos polínicos comienzan a llegar a la base del estilo a los 3 días y la fecundación ocurre 6 días después de la polinización. 'Moniquí' se comporta como cultivar autoincompatible. Este hecho justifica los cuajados erráticos observados en campo. Sin embargo, una buena polinización subsana este hecho. El examen de la compatibilidad polen-pistilo, unido a los datos de floración, indica que 'Búlida', 'Canino' y 'Royal' serían cultivares polinizadores adecuados para 'Moniquí'. Por otro lado, el patrón de caída y crecimiento de frutos refleja que durante las 2 primeras semanas después de anthesis se decide el curso que van a tomar estos acontecimientos. La similitud entre los patrones de las flores polinizadas y sin polinizar indican que estos procesos se encuentran altamente influenciados por factores intrínsecos a la flor e independientes de la polinización, que constituirían lo hasta ahora invocado como calidad de flor.

Con el fin de conocer qué es la calidad de flor, se ha valorado el estado nutritivo del pistilo. Para ello se ha desarrollado un método que, mediante la combinación de técnicas histoquímicas y análisis de imagen, permite evaluar el contenido de almidón al microscopio. El examen secuencial de flores ha puesto de manifiesto que el pistilo se desarrolla inicialmente a partir de sus propias reservas, que se encuentran compartimentalizadas en su interior, y que siguen un patrón de consumo independiente unas de otras. El almidón que se encuentra en la flor en anthesis condiciona de manera directa la fecundación y el inicio de la fructificación, y su pérdida es determinante en el proceso de degeneración del óvulo secundario. El hecho de que las reservas que presenta el pistilo en anthesis influyen en la fecundación y en la fructificación, unido a que existen claras diferencias entre flores en cuanto a su contenido de almidón, explica el diferente éxito reproductivo que se produce entre las flores y desvela que el principal determinante de la calidad de flor es su contenido de almidón.

SUMMARY

Erratic fruit set is usually related to bad weather conditions. However, when these conditions cannot explain satisfactorily the results obtained under orchard conditions, they are related to something still unknown, but inherent to the flower and termed flower quality. This work studies what determines flower quality and explores the role played by starch reserves within the flower in this quality. Consequently, flower biology and its implications for fruit set have been studied in apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivar Moniqui. In a first step, floral bud development and the progamic phase -between pollination and fertilization- have been characterized and fruit growth and fruit drop patterns in the field established. Within this framework, flower quality has been examined in terms of the effect that pistilar starch reserves have on both fertilization and fruit set.

Pistil development and most of ovule growth takes place after budbreak. The first pollen tubes arrive to the base of the style 3 days after pollination and fertilization takes place 6 days after pollination. The observation that 'Moniqui' behaves as a self-incompatible cultivar explains the erratic fruit sets often observed in the field as well as the fact that supplemental pollination results in a higher yield. Taken together the results obtained from compatibility combinations and from the flowering dates of the different apricot cultivars studied, 'Bulida', 'Canino' and 'Royal' appear as appropriate pollinating cultivars for 'Moniqui'. On the other hand, the pattern of fruit drop and fruit development shows that the first two weeks after anthesis are decisive in the final outcome of those two processes. The similar pattern obtained using pollinated and unpollinated flowers indicates that those processes are independent of pollination and highly dependent on factors inherent to the flower and that could constitute what has been so far termed flower quality.

In order to study what determines flower quality, the nutritive status of the pistil has been examined through the development of a method combining histochemical and image analysis techniques to evaluate starch content under the microscope. Sequential examination of pistilar tissues has shown that the initial stages of pistil development are dependent on its own reserves and that those reserves are compartmentalized inside the pistil, each one following an independent consumption pattern. The amount of starch present within the flower at anthesis appears as a key factor both in fertilization success and in the initial steps of fruit development; its disappearance is determinant in the degenerative process of the secondary ovule. The observations that pistilar reserves at anthesis affect fertilization and fruit development and that clear differences in starch content are recorded among pistils could explain the differences in the reproductive success found among flowers and points at starch content within the pistil as the main factor determining flower quality.



ABREVIATURAS

A	Area
ADN	Acido desoxiribonucleico
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (análisis de varianza)
ARN	Acido ribonucleico
ASCII	<i>American standar code for information interchange</i>
BOE	Boletín Oficial del Estado
CA	Calaza
CM	Cuadrados Medios
cv	Cultivar
CV	Coefficiente de variación
DGA	Diputación General de Aragón
DO	Densidad óptica
EE	Estación Experimental
ETSIA	Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos
F	Prueba F (Fisher)
FAA	70% etanol : acido acético glacial : formaldehído (18:1:1, v/v)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
GL	<i>Grey level</i> (nivel de gris)
gl	Grados de Libertad
IAA	<i>Indol Acetic Acid</i> (Acido 3-Indol Acético)
L	Longitud
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
m	Masa
MEC	Ministerio de Educación y Ciencia
NG	Nivel de gris
n	Número básico de cromosomas
ns	No significativo
NU	Nucela
OB	Obturador
OV	Ovulo
p	Probabilidad
PAS	<i>Periodic acid Schiff's reagent</i>
R	Coefficiente de correlación
R ²	coeficiente de regresión
RD	Real Decreto
SC	Suma de Cuadrados
SIA	Servicio de Investigación Agroalimentaria
sd	<i>Standar desviation</i> (desviación estándar)
se	<i>Standar error</i> (error estándar)
SE	Saco embrionario
I	Transmitancia
TBA	Alcohol butílico terciario
IE	Tegumento
II	Tejido transmisor
UE	Unión Europea
UPM	Universidad Politécnica de Madrid
v	Volumen

1. INTRODUCCION GENERAL

1. INTRODUCCION GENERAL

1.1 EL ALBARICOQUERO

El albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) pertenece a la subfamilia Prunoidea dentro de la familia Rosaceae. En el extenso género *Prunus*, con aproximadamente 175 especies distribuidas en tres subgéneros (*Amigdalus*, *Prunophora* y *Cerasus*), se suele agrupar junto a ciruelos en el subgénero *Prunophora*. El número básico de cromosomas (n) de la especie es 8, mientras que el somático (2n) es 16.

1.1.1 Características botánicas

Se trata de un árbol de porte globoso que puede llegar a los 7 m de altura, de raíz pivotante y tronco erguido. Al igual que en otras especies del género *Prunus*, las yemas de flor no tienen hojas, únicamente flores, y son laterales, nunca terminales. Las flores, que se presentan normalmente solitarias o en grupos de 2-3, son blancas o ligeramente rosadas, con el cáliz rojizo y el pedúnculo muy corto. El fruto es una drupa globosa, con un surco ventral que la divide en dos partes, de color amarillo más o menos intenso y aterciopelado. Las hojas son alternas, lampiñas brillantes, rojizas en los brotes jóvenes, ligeramente acorazonadas, acuminadas, aserradas no muy profundamente, y con el peciolo largo, a veces rojizo en la parte correspondiente al haz. Se trata de una planta histeranta, ya que la emisión de las hojas se produce después de la floración (Forte, 1992). Fructifica sobre madera del año, produciendo ramos de mayo, chifonas y ramos mixtos. A diferencia de otras especies del género *Prunus*, *P. armeniaca* tiene facilidad para desarrollar nuevos brotes sobre madera vieja, que, a veces, permanecen cortísimos, dando la impresión de fructificar sobre la madera antigua (Fábregas, 1981). Las yemas se insertan sobre los nudos, bastante abultados, pudiendo encontrarse en un mismo nudo una yema de madera, una de flor, dos de flor o dos de flor y una de madera (Got, 1963).

1 1.2. Origen del cultivo

La especie *P. armeniaca* parece ser originaria del Turkestán chino, considerándose la región montañosa del Tien Shan su hábitat natural, cuya población humana tenía en los albaricoques su principal fuente de azúcar (Got, 1963). Se encuentran bosques de albaricoqueros espontáneos entre 1 200 y 2 200 m de altitud, desde Corea del Norte hasta Manchuria, Mongolia y norte de China (Bailey y Hough, 1975).

Su cultivo comenzó hace más de 3 000 años en China, desde donde se expandió a Asia central, Irán, Asia menor, Armenia y Siria (Crossa-Raynaud y Audergon, 1987). A Europa llegó por dos caminos: en el siglo I a.C., procedente de Armenia a través de Grecia e Italia, y en el siglo VII, cuando los árabes lo introdujeron en España (Got, 1963). En Europa se puede hablar de auténticas plantaciones a partir del siglo XVII (Forte, 1992), mientras que al continente americano llegó en 1720 (Westwood, 1982).

1 1.3. Exigencias climáticas

Aunque la especie se encuentra en hábitats muy diversos, desde los oasis saharianos hasta el Himalaya, las zonas donde se pueden establecer plantaciones comerciales son más restringidas (Vidaud, 1980). Las zonas actuales de cultivo se encuentran situadas en altitudes inferiores a 600 m (Got, 1963). Los cultivares se suelen adaptar únicamente a áreas geográficas con unas condiciones ecológicas muy determinadas (Bailey y Hough, 1975). Las diferencias climáticas entre las distintas regiones donde se cultiva dan como resultado importantes diferencias entre los grupos varietales existentes en cada una de ellas (Paunovic, 1980). La mayor extensión del cultivo se localiza en las zonas costeras de clima mediterráneo, así como en determinadas áreas semicontinentales templadas, con inviernos fríos y veranos cálidos y secos (Bailey y Hough, 1975).

De origen continental, soporta temperaturas de hasta -20°C en invierno, pero el momento crítico se sitúa en primavera, ya que los órganos florales son muy sensibles a las bajas temperaturas en estas fechas. También pueden ser perjudiciales los inviernos demasiado templados, al no cubrirse las necesidades de frío invernal, que oscilan entre 350 y 1100 horas por debajo de 7°C según cultivares (Tabuena,

1967), lo que puede provocar anomalías en la floración. Por otra parte, se trata de una especie exigente en luz, pudiendo provocar las insolaciones deficientes una disminución de la producción, así como falta de coloración en los frutos.

1.1.4 Material vegetal

La difícil adaptación ecológica de los distintos cultivares de albaricoquero a diferentes zonas climáticas, así como los importantes problemas de incompatibilidad patrón-injerto (Herrero, 1951; Errea y Felipe, 1992) han provocado la búsqueda y utilización de nuevos cultivares y patrones.

1.1.4.1 Cultivares

Aunque ya los romanos conocían la técnica del injerto, el uso de plantas injertadas en plantaciones frutales es relativamente reciente, lo que puede explicar la gran cantidad de cultivares de albaricoquero que todavía existen en Europa (Crossa-Raynaud y Audergon, 1987). Según Crossa-Raynaud (1961), el albaricoquero se distribuyó en tres direcciones a partir de China: 1) hacia Oriente Medio, Egipto y África del Norte. De este grupo podrían provenir los cultivares norteafricanas, con floración abundante, muy precoces, autoincompatibles, frutos de pequeño calibre, y muy bajas exigencias de frío invernal; 2) hacia Europa, por Grecia e Italia, originando los cultivares cultivados en Francia, Italia, y posteriormente, California, Suráfrica y Australia. Casi todas ellas son autocompatibles, presentan una fructificación media o tardía, y tienen grandes exigencias de frío invernal; 3) hacia el Oriente de Asia, hasta Japón, originando cultivares muy resistentes a las heladas. Los cultivares españoles podrían provenir del cruzamiento de cultivares de los dos primeros grupos, presentando bajas exigencias de frío y autocompatibilidad completa (Forte, 1992), aunque en los últimos años se han detectado cultivares autoincompatibles en Murcia (Egea *et al.*, 1991; Burgos *et al.*, 1993). A pesar del gran número de cultivares de esta especie son muy numerosos, su gran sensibilidad a los diferentes microclimas les impide normalmente ser transferidos de una zona a otra (Bailey y Hough, 1975). Casi todos ellos presentan una gran variabilidad de caracteres, constituyendo en muchos casos variedades-población, con muchos clones distintos (Forte, 1992).

La distribución varietal en España es muy amplia. Sin embargo, la mayor parte del cultivo recae en pocos cultivares (Tabla 1.1). En Murcia, Albacete y Zaragoza, el albaricoquero se cultiva mayoritariamente en regadío, mientras que en Valencia, Castellón, Alicante y Baleares, es más habitual el cultivo en secano. En los últimos años está aumentando la superficie cultivada de cultivares como 'Galta Rocha', de excelentes cualidades para consumo en fresco, y 'Tadeo', resistente a la manipulación post-cosecha (Forte, 1992). Sin embargo, ha disminuido el cultivo de otros cultivares, como 'Moniquí', que, pese a sus excelentes aptitudes para consumo en fresco, presenta graves problemas de producción.

Aunque los cultivares más utilizados mantienen un nicho comercial ya establecido, es necesario obtener nuevos cultivares que cubran las nuevas necesidades del cultivo. Para el consumo en fresco se tiende hacia los albaricoques de carne blanca y de gran tamaño. En cuanto a las necesidades de cultivo, los programas de mejora van dirigidos fundamentalmente a la obtención de cultivares autocompatibles y resistentes a *sharka* (Badenes *et al.*, 1996a y 1996b).

1.1.4.2. Patrones

Tradicionalmente se han empleado patrones francos de *P. armeniaca*, pero su difícil adaptación a las condiciones adversas del suelo, ocasionando problemas de asfixia en suelos mal drenados, su sensibilidad ante patógenos y la necesidad de rentabilizar las explotaciones, han hecho necesaria la búsqueda de portainjertos alternativos (Espada, 1989). El comportamiento de los cultivares de albaricoquero con respecto a su respuesta al injerto no es homogéneo, pudiéndose establecer 2 grupos en función de su tendencia a la compatibilidad. Así, se considera poco exigentes a un grupo de cultivares en el que se encuentran 'Paviot', 'Búlida' y 'Luizet', mientras que 'Moniquí', 'Canino' y otros cultivares de gran interés agronómico y comercial presentan muchos problemas a la hora de encontrar portainjertos adecuados. Aunque actualmente se dispone de una amplia gama de patrones adaptados a condiciones de cultivo adversas (Tabla 1.2), todavía es necesaria la obtención de otros nuevos que resuelvan los problemas de incompatibilidad que se presentan fundamentalmente con algunos ciruelos y melocotoneros (Felipe, 1990; Errea, 1991).

Tabla 1.1. Superficie cultivada (ha), porcentaje sobre la superficie cultivada total y área de cultivo de los principales cultivares de albaricoquero cultivados en España

Cultivar	SUPERFICIE CULTIVADA	%	AREA DE CULTIVO
Búlida	11.000	47 - 50	Murcia, Albacete
Canino	4.000	15 - 18	Valencia, Castellón
Galta Rocha	1.500	6 - 8	Valencia
Moniqui	1.300	6 - 8	Murcia, Albacete, Zaragoza
Paviot	1.300	5 - 6	Zaragoza
Real Fino	700	3 - 4	Murcia
Tadeo	650	3	Valencia
Rojo de Carlet	400	2	Valencia
Corbatón	200	1	Valencia

(MAPA, 1991; Forte, 1992)

Tabla 1.2. Patrones para albaricoquero más utilizados en España

PATRONES		AFINIDAD	VIGOR	RESISTENCIA A ASFIXIA	RESISTENCIA A CLOROSIS	PRECOCIDAD
ALBARICOQUERO FRANCO		Buena	Elevado	Escasa	Elevada	Medio-tardía
CIRUELOS CRECIMIENTO RÁPIDO	Mirobolán	Variable	Medio-Elevado	Mediocre	Elevada	Temprana-tardía
	Mariana	Variable	Medio-Elevado	Elevada	Alta	Tardía
CIRUELOS CRECIMIENTO LENTO	Pollizo	Variable	Medio	Elevada	Alta	Temprana
	Reina Claudia	Buena-Discreta	Medio-Elevado	Elevada	Alta	Tardía
MELOCOTONERO FRANCO		Variable	Medio-Elevado	Escasa	Escasa	

(Crossa-Raynaud y Audergon, 1987; Espada, 1989; Felipe, 1989 y 1990)

1.1.5 Situación del cultivo

La mayor parte de la producción mundial (60%) se concentra en la cuenca mediterránea. Otras zonas importantes de producción se encuentran en Asia y California. Los principales países productores son Turquía, España, Italia, Francia, Estados Unidos, Pakistán e Irán (FAO, 1995) (Tabla 1.3). En España, las principales áreas de cultivo se localizan en las comunidades de Murcia, Valencia, Castilla-La Mancha, Aragón y Baleares (Tabla 1.4) (MAPA, 1995). La superficie en plantaciones regulares ha crecido continuamente a partir del final de la década de los 80 para estabilizarse en la actualidad en 25.000 ha (MAPA, 1995 y 1996).

Mientras que en otras especies frutales se produce una continua renovación varietal, en albaricoquero, la marcada zonalidad de la especie, cuyos cultivares suelen adaptarse a áreas geográficas con unas condiciones ecológicas muy determinadas (Bailey y Hough, 1975), dificulta el traslado de cultivares de unas zonas de cultivo a otras, salvo excepciones como 'Canino', lo que ha provocado que la estructura varietal no haya evolucionado al mismo ritmo que en otras especies frutales. La superación de esta zonalidad permitiría una mayor oferta varietal, que conllevaría una diversificación de las zonas de cultivo.

En Aragón, es un cultivo tradicional que experimentó una expansión en la década de los 60 para posteriormente sufrir una recesión en la de los 80, sobre todo en el cultivar Moniquí (DGA, 1987). Sin embargo, este descenso del cultivo no ha venido provocado por una disminución de la demanda, ya que este cultivar presenta excelentes características organolépticas para su consumo en fresco, sino por problemas de rentabilidad en las plantaciones, al presentar con frecuencia bajas producciones, ocasionadas por falta de cuajado.

El desconocimiento de la causa de estos cuajados erráticos ha impedido dar una respuesta a esta problemática. La localización de los cuellos de botella productivos en esta especie permitiría el manipularlos, especialmente en aquellos cultivares que ya tienen un nicho comercial claro pero que presentan graves problemas de producción, como ocurre con 'Moniquí' en Aragón. Por otra parte, un conocimiento más profundo de la biología reproductiva podría delimitar un marco en el que poder estudiar la causa de la zonalidad de los cultivares de la especie. Para ello es necesario conocer el funcionamiento del proceso reproductivo de la especie, desde la formación de las yemas fructíferas hasta el cuajado del fruto, pasando por

la floración y la interacción polen-pistilo, para poder así determinar los mecanismos que regulan el nivel de cuajado.

Tabla 1.3. Producción (x 1000 t) y porcentaje sobre la producción mundial de los principales países productores de albaricoques.

PAIS	PRODUCCION	%
Turquía	400	17
España	199	8
Italia	192	8
Francia	156	7
Estados Unidos	144	6
Pakistán	140	6
Irán	118	5
Total Mundo	2360	100

(FAO, 1995; EUROSIAI, 1996)

Tabla 1.4. Producción (x 1000 t) y porcentaje sobre la producción total de las principales provincias productoras de albaricoques en España.

PROVINCIA	PRODUCCION	%
Murcia	126.372	60
Valencia	41.001	20
Albacete	16.700	8
Zaragoza	4.990	2
Baleares	4.227	2
Castellón	3.875	2
Alicante	3.300	2
Total España	210.034	100

(MAPA, 1995)

1 2 BIOLOGIA FLORAL

Las Angiospermas se caracterizan por encerrar sus semillas en el interior de un fruto. Su ciclo reproductivo, al igual que en otras plantas, está determinado por la alternancia de dos generaciones, un gametofito generalmente haploide y un esporofito generalmente diploide. El esporofito produce esporas, que una vez desarrolladas dan lugar a los gametofitos, que a su vez producen los gametos. En las Angiospermas, la fase gametofítica es más corta y menos compleja que la esporofítica, y tiene lugar en órganos especializados en el interior de las flores, caracterizándose por la dependencia nutricional de los gametofitos respecto al esporofito (Esau, 1977). Así, el gametofito masculino o grano de polen se desarrolla en la antera, mientras que el gametofito femenino o saco embrionario lo hace en el interior del óvulo. El grano de polen produce los gametos masculinos o células espermáticas, mientras que el saco embrionario alberga el gameto femenino u ovocélula. La reproducción sexual requiere la llegada de las espermáticas, vía tubo polínico, al saco embrionario, donde tiene lugar la fecundación y se produce un nuevo esporofito diploide, iniciándose de nuevo el ciclo (Jensen, 1973).

1 2 1. Inducción y diferenciación floral

Las yemas fructíferas en los frutales de hoja caduca se forman durante la estación de crecimiento vegetativo y la diferenciación de sus partes principales ocurre en la mayoría de los casos antes de la caída de hojas. Se diferencian por lo tanto en el año anterior al de su floración.

El cambio fisiológico que provoca que una yema sin diferenciar se transforme en una yema de flor se denomina inducción floral, mientras que el cambio morfológico que experimenta una yema fructífera se denomina diferenciación floral. La iniciación floral depende de la acción de factores internos y externos que varían en función de la especie e incluso del cultivar. Se trata de un fenómeno complejo en el que parece ser necesario un equilibrio hormonal relacionado a su vez con las reservas de carbohidratos; a dicho equilibrio se llega cuando el árbol o alguno de sus órganos alcanza un cierto nivel de formación de reservas (Gil-Albert, 1989).

La duración de la fase de desarrollo floral comprendida entre la iniciación floral y la antesis oscila entre 6 y 10 meses (Westwood, 1982). El desarrollo de las

yemas florales en albaricoquero, y en general en todos los *Prunus*, sigue 4 fases (Brown, 1960): desde la plena floración hasta la caída de hojas, de la caída de hojas a la llegada del invierno, el reposo y desde el final de éste hasta la floración. La iniciación floral en albaricoquero se produce normalmente en agosto, antes de la caída de hojas, pero después de la maduración del fruto (Westwood, 1982), diferenciándose en cada yema una sola flor con un único carpelo, aunque ocasionalmente pueden diferenciarse dos carpelos en una flor (Sterling, 1964).

En la mayoría de especies frutales, las yemas florales, una vez diferenciadas, se desarrollan rápidamente, distinguiéndose todas las partes florales (pétalos, sépalos, anteras y pistilos) antes del reposo invernal (Tufts y Morrow, 1925; citado en Westwood, 1982). Durante el reposo, el crecimiento se ralentiza, para reanudarse de nuevo con rapidez en la primavera siguiente. Durante toda esta fase muchos factores influyen en el desarrollo de la yema; entre otros, parecen importantes el nivel de reservas hidrocarbonadas, la disposición de agua y elementos nutritivos, la presencia de reguladores de crecimiento y los requerimientos de frío (Westwood, 1982). El proceso del desarrollo de la yema culmina en primavera tras el desborre con la apertura de la flor o antesis.

1.2.2. Anatomía de la flor

El género *Prunus* está compuesto por plantas hermafroditas de polinización entomófila, con flores periginas y que, al igual que en la mayoría de las Rosáceas, son bisexuales (Wyatt, 1983). El albaricoquero presenta un cáliz gamosépalo rojizo de 5 puntas, una corola de 5 pétalos blancos o ligeramente rosados y de 25 a 30 estambres insertos en el borde del receptáculo, que tiene forma de copa, poco profundo y en cuyo fondo nace un carpelo único, aunque la presencia de algunas flores bicarpeladas es frecuente en *Prunus* (Sterling, 1964). Las flores se presentan normalmente solitarias o en grupos de 2-3, con un pedúnculo muy corto (Forte, 1992).

El pistilo en *Prunus* está formado por un estigma de tipo húmedo (Raff *et al.*, 1981; Uwate y Lin, 1981; Herrero y Arbeloa, 1989), un estilo con un tejido transmisor de tipo compacto y un ovario unicarpelar con dos óvulos anátropos, colocados cada uno sobre un margen carpelar (Esau, 1977). Los óvulos son bitégmicos, crasinucelados y con un saco embrionario de tipo *polygonum*.

(Maheshwhari, 1950) El ovario presenta en su parte superior dos obturadores, que crecen en la pared ventral del carpelo por encima de cada uno de los dos óvulos (Sterling, 1964)

La gametogénesis femenina tiene lugar en el óvulo o primordio seminal. El saco embrionario se encuentra rodeado de un tejido envolvente, la nucela, que a su vez se encuentra recubierta por uno o dos tegumentos que son discontinuos en una zona, el micropilo. La conexión vascular con la placentia se efectúa a través del funículo. En el tipo *polygonum*, el más común en las Angiospermas (Maheshwhari, 1950), la megaspora resulta de la división meiótica de la célula madre de la megaspora o megasporocito. Tres de las megasporas formadas degeneran, sufriendo la otra 3 divisiones mitóticas, dando lugar al saco embrionario, formado por 8 núcleos divididos en 7 células que se organizan espacialmente de forma característica: 3 antípodas en el extremo del saco orientado hacia la calaza, 2 sinérgidas y la ovocélula en el extremo micropilar y la célula central con 2 núcleos polares ocupando la mayor parte del espacio interior.

La gametogénesis masculina comienza tras una división meiótica de las células madres del polen, dando lugar a 4 microsporas. Estas sufren una división mitótica produciendo el núcleo vegetativo y la célula generativa, la cual se vuelve a dividir dando lugar a las 2 espermátidas o gametos masculinos. En frutales, el grano de polen es binucleado y la segunda división mitótica ocurre una vez que éste ha germinado.

1.2.3 De polinización a fecundación

La fase comprendida entre la polinización y la fecundación se denomina fase progámica (Linskens, 1986). La fecundación o fusión de la ovocélula y una de las espermátidas y el posterior desarrollo de la semilla son requisitos previos al cuajado de frutos en la mayoría de los frutales de zonas templadas. En algunas especies se pueden producir frutos sin fecundación previa, desarrollándose bien sin semillas (partenocarpia) como en platanera, algunos cítricos, higuera, vid y, en ocasiones, peral y manzano, o bien desarrollando semillas sin fecundación (apomixis) como en algunos cítricos (Westwood, 1982; Gil-Albert, 1989; Polito, 1990). En los frutales de hueso, la fecundación de al menos uno de los dos óvulos es necesaria, puesto que no desarrollan frutos partenocárpicos ni apomícticos de forma natural, y mediante



la aplicación de productos químicos no se han conseguido frutos completamente normales (Crane, 1969; Arbeloa, 1986).

El tubo polínico debe atravesar el pistilo en su camino hacia el óvulo. Las distintas estructuras que atraviesa el gametofito masculino interactúan con él, sirviéndole de apoyo tanto a nivel nutricional como direccional (Herrero y Hormaza, 1996). Las principales estructuras que atraviesan los tubos polínicos son el estigma, el estilo y el ovario.

1.2.3.1. Estigma

La polinización consiste en el traslado del grano de polen desde las anteras al estigma, y puede realizarse por contacto directo, por medio del viento, del agua o por la acción de distintos animales, siendo la más común en frutales la polinización entomófila, realizada principalmente por abejas.

En el caso de los estigmas húmedos, el contacto tiene lugar entre el grano de polen y la secreción extracelular que se produce en la superficie estigmática, compuesta por lípidos, antioxidantes, aminoácidos, proteínas y carbohidratos (Knox, 1984). Cuando se trata de estigmas secos, que se encuentran cubiertos por una cutícula recubierta a su vez por una película proteica, el contacto se establece entre las proteínas de la pared del polen y la película proteica del estigma (Mattson *et al.*, 1974).

En *Prunus*, el estigma está formado por papilas turgentes, que degeneran según el estigma madura, produciendo una secreción (Herrero y Arbeloa, 1989). En estas condiciones, los granos de polen quedan adheridos al estigma, donde se hidratan y germinan, dando lugar al tubo polínico.

El grano de polen maduro está rodeado por una pared compuesta por dos capas, la exina en el exterior y la intina en el interior. La exina sirve de protección y tiene una estructura característica de cada especie, presentando una serie de orificios, los *colpus*, que cuando el polen está deshidratado se encuentran taponados por lípidos (Heslop-Harrison, 1976). Cuando el grano de polen se hidrata estos lípidos se dispersan, quedando expuesta la intina, que da lugar al tubo polínico a través de uno de los *colpus*.

1.2.3.2 Estilo

Tras hidratarse, el grano de polen germina produciendo el tubo polínico. A través de las papilas del estigma en los estigmas húmedos (Shivanna, 1982) y atravesando la cutícula en los estigmas secos (Went y Willemse, 1984), el tubo polínico llega al tejido transmisor del estilo. El crecimiento de los tubos polínicos depende de las estructuras por las que crecen. Así, el estigma y el estilo guían y nutren a los tubos polínicos mediante secreciones (Sedgley y Buttrose, 1978; Tilton y Horner, 1980; Sedgley y Scholefield, 1980; Tilton *et al.*, 1984). Hasta la llegada al tejido transmisor el crecimiento del tubo polínico es autótrofo, nutriéndose de sus propias reservas (Herrero y Dickinson, 1980), pero una vez que deja atrás el estigma necesita nutrirse de las reservas del tejido transmisor, por lo que el crecimiento pasa a ser heterótrofo (Herrero y Dickinson, 1979).

La función de la célula vegetativa del tubo polínico parece ser la producción de las paredes del tubo, que están formadas de callosa en el interior y de celulosa en el exterior. A medida que va creciendo el tubo polínico, tanto la célula vegetativa como la generativa, y posteriormente las células espermáticas tras la mitosis, se sitúan en el extremo del tubo, quedando aisladas de los restos no funcionales mediante tapones de callosa.

1.2.3.3 Ovario

El crecimiento de los tubos polínicos a lo largo del estigma y el estilo se produce con rapidez, pero al llegar a la base del estilo este crecimiento se ralentiza, existiendo diversas estructuras que regulan y filtran el paso de los tubos hasta el óvulo por medio de secreciones (Herrero y Arbeloa, 1989; Herrero y Hormaza, 1996). Así, en algunas especies, cuando los tubos abandonan el tejido transmisor y alcanzan el ovario, se encuentran con una protuberancia de la placenta definida como obturador (Sterling, 1964; Tilton y Horner, 1980).

En melocotonero esta estructura actúa como puente de unión temporal, regulando el paso del tubo polínico entre el estilo y el óvulo mediante la producción, en un momento determinado, de una secreción necesaria para el crecimiento del tubo polínico. Cuando los tubos llegan al obturador, detienen su crecimiento durante 5 días. En este tiempo, el almidón presente en las células del

obturador desaparece, produciéndose la secreción que condiciona el posterior crecimiento de los tubos (Arbeloa y Herrero, 1987) Por lo tanto, el crecimiento de los tubos sigue siendo heterótrofo, al igual que en el estilo

A pesar de que la distancia hasta el óvulo es considerablemente menor que la distancia recorrida hasta este punto, no todos los tubos polínicos llegan a penetrar en el óvulo (Herrero, 1992a), produciéndose una serie de procesos que influyen en la llegada del tubo polínico al saco embrionario (Herrero, 1992a; Herrero y Hormaza, 1996).

Una vez sobrepasado el obturador, en melocotonero tiene lugar una nueva parada en el exostoma (Herrero y Arbeloa, 1989), previa a la entrada del tubo en el óvulo. Tras esta parada se han observado tubos que se desvían del camino hacia el micropilo, siendo incapaces de entrar en el óvulo. Parece que de nuevo hay un efecto regulador del pistilo sobre el camino de los tubos polínicos. Mientras que a lo largo del estilo los tubos siguen el camino trazado por las reservas de almidón (Herrero y Dickinson, 1979), la regulación de la entrada al óvulo parece deberse a un efecto quimiotrópico (Tilton y Lersten, 1981; Herrero, 1992b) Por lo tanto, además de factores externos como la temperatura, el pistilo también influye en el crecimiento de los tubos polínicos, condicionando la fecundación (Herrero, 1992b)

Posteriormente, el tubo polínico entra en el óvulo a través del micropilo (porogamia), salvo en un número reducido de especies en las que lo hace a través del funículo y la calaza (calazogamia) (Maheshwhari, 1950), atravesando posteriormente la nucela en su camino hacia el saco embrionario.

La entrada al saco embrionario se realiza a través de una de las sinérgidas, que en muchas especies ha degenerado antes de la llegada del tubo (Schulz y Jensen, 1968) El tubo polínico crece a través del aparato filiforme de la sinérgida, cesa su crecimiento una vez dentro y libera los gametos masculinos. Uno de ellos se fusiona con la ovocélula, dando lugar al cigoto, mientras que el otro lo hace con la célula central, donde los núcleos con frecuencia se encuentran ya fusionados, produciendo el endospermo. El cigoto es diploide, y constituye la primera célula de la generación esporofítica, dando lugar al embrión, mientras que el endospermo es triploide y comienza su crecimiento antes que el embrión, nutriéndole en los primeros estados de desarrollo. El conjunto de las dos fusiones se denomina doble fecundación.

A lo largo del camino del tubo polínico se producen una serie de cambios en

las estructuras pistilares. Mientras que algunos de estos cambios, como la secreción producida por el obturador en melocotonero, no están afectados por la presencia de los tubos polínicos (Arbeloa y Herrero, 1987), otros, como la desaparición del almidón en el tejido transmisor se producen como respuesta a la polinización (Herrero y Dickinson, 1979). Por otro lado, la maduración y degeneración del saco embrionario se ve afectada por la polinización tanto en albaricoquero (Burgos y Egea, 1993) como en almendro (Pimienta y Polito, 1983) y peral (Herrero y Gascón, 1987).

Una vez completada con éxito la fase de desarrollo floral con la doble fecundación, se forman el endospermo y el embrión. Paralelamente al proceso de fecundación, en el resto de la flor se producen una serie de cambios que desembocarán en la transformación del ovario en fruto.

Durante el proceso de diferenciación floral, desde la iniciación floral hasta la antesis, y durante la fase comprendida entre la polinización y la fecundación se producen numerosos cambios que desembocan en el cuajado del fruto. El estudio de la evolución de las yemas florales y de los cambios que ocurren en la fase comprendida entre la polinización y la fecundación permitiría caracterizarlos en albaricoquero y conocer la influencia que tienen tanto en el proceso reproductivo como en la fructificación.

1 2 4. Incompatibilidad polen-pistilo

Tras la polinización se produce el proceso de reconocimiento del polen por parte del pistilo mediante la expresión del sistema de compatibilidad polen-pistilo, por la que el grano de polen o el tubo polínico es aceptado o rechazado (de Nettancourt, 1977). Este fenómeno se puede producir en el estigma, impidiendo germinar a los granos de polen no compatibles, o en el estilo, donde los tubos polínicos incompatibles detienen su crecimiento. Si en la reacción de reconocimiento están involucradas sustancias producidas por la planta progenitora del polen, el control que se produce es esporofítico, mientras que si las sustancias son producidas por el propio grano de polen o tubo polínico, el control se considera gametofítico.

La incompatibilidad gametofítica suele materializarse en el estilo y está asociada a polen binucleado, mientras que la esporofítica tiene lugar en el estigma y está asociada a polen trinucleado y estigmas secos (Brewbaker, 1957). Los frutales

tienen un sistema de incompatibilidad gametofítica (East y Mangelsdorf, 1925), por lo que en *Prunus* es en el estilo donde se expresa el sistema de incompatibilidad, interrumpiéndose el crecimiento de los tubos polínicos (Crane y Brown, 1937). Se produce entre flores morfológicamente iguales, dependiendo del genoma haploide del grano de polen y del diploide del pistilo, y con un único *locus* implicado en el proceso. Es, por lo tanto, un sistema homomórfico, gametofítico y monofactorial (de Nettancourt, 1977). En algunas especies de *Prunus*, como el melocotonero, la mayoría de los cultivares cultivados son autocompatibles, mientras que en otros casos, como el almendro y el cerezo, son mayoritariamente autoincompatibles. El origen clonal de los cultivares frutales, al tener todos los individuos de una plantación un mismo genotipo, hace necesario intercalar árboles de un cultivar polinizador entre los del cultivar cultivado cuando éste es autoincompatible. Aunque el albaricoquero se ha considerado especie autocompatible (Bailey y Hough, 1975), la existencia de cultivares autoincompatibles es conocida desde hace tiempo en Estados Unidos (Schultz, 1948) y, más recientemente, en Europa (Nyujto *et al*, 1985) y Nueva Zelanda (McLaren y Fraser, 1996). Del mismo modo, en Murcia se han encontrado varios cultivares que presentan problemas de autoincompatibilidad (Egea *et al* 1991; Burgos *et al* 1993).

La observación al microscopio de la interacción que se produce entre el pistilo y los tubos polínicos permitiría, por un lado, determinar hasta qué punto esta interacción influye en el proceso de cuajado de fruto, como ocurre en otras especies frutales, y por otro, establecer el grado de autocompatibilidad de 'Moniquí' y las relaciones de intercompatibilidad con otros cultivares y su posible repercusión agronómica.

1.3. FRUCTIFICACION

Los óvulos fecundados, tras completar su desarrollo, se convierten en semillas. En *Prunus*, tras la doble fecundación se produce un engrosamiento de la nucela, que crece hasta completar el tamaño final de la semilla. Paralelamente, los núcleos del endospermo continúan multiplicándose hasta que se produce la citocinesis, apareciendo la tabicación celular, con lo que el endospermo pasa a la fase celular. Comienza entonces un rápido crecimiento del endospermo a expensas de la nucela, seguido del crecimiento del embrión a expensas del endospermo, hasta llegar a ocupar la totalidad de la semilla. En albaricoquero, la nucela completa su crecimiento a los 20-25 días, el endospermo a los 35-40 días y el embrión alcanza su tamaño definitivo a los 60 días (Jackson y Coombe, 1966). Paralelamente, la pared del ovario o pericarpio continúa su desarrollo. Al igual que en otros muchos frutos, en *Prunus* el pericarpio está formado por tres capas: el exocarpio o epicarpio, que es la piel exterior, el mesocarpio, que una vez desarrollado es la parte comestible y el endocarpio, que es leñoso y encierra la semilla.

1.3.1. Cuajado de frutos

El porcentaje de cuajado es el número de frutos que permanecen en el árbol respecto al número de flores en anthesis. Sin embargo, se puede hablar de diferentes tipos de cuajado. Así, el cuajado inicial se refiere a los frutos que comienzan a crecer en los días siguientes a la fecundación (Sedgley y Griffin, 1989), y está asociado a las flores en las que el ovario comienza un rápido crecimiento tras la anthesis; el cuajado final es el resultado de la competencia entre frutos y, por último, el cuajado de recolección, asociado a los frutos que han superado los últimos factores climáticos adversos (Goldwin, 1992).

Para que una flor cuaje, se requiere que tenga algún gameto femenino viable, que al estigma lleguen granos de polen, que las condiciones ambientales no sean adversas, que se produzca la fecundación y que el fruto se desarrolle. Alteraciones en este proceso pueden desembocar en falta de cuajado. Mientras que los casos de esterilidad masculina se solucionan con una polinización adecuada (Herrero y Salvador, 1980), la esterilidad femenina es responsable de falta de cuajado (Jaumien, 1968; Stern *et al.*, 1996). Por otro lado, la autoincompatibilidad polen-pistilo se

puede solucionar mediante el empleo de cultivares polinizadores. Aunque el cuajado inicial generalmente se asocia a la fecundación, otros factores pueden estar involucrados, ya que un rápido engrosamiento del ovario también puede producirse en frutos no partenocárpicos sin polinizar (Sedgley, 1980).

1.3.2. Crecimiento del fruto

El desarrollo del fruto es el resultado de la acción conjunta de la división celular y el engrosamiento celular. El período de división celular es mucho más corto que el de engrosamiento celular y le precede, aunque hay una fase en la que coinciden los dos procesos. El número final de células depende del número inicial en antesis y de la velocidad y duración de la división celular. Ambas fases condicionan el tamaño final del fruto. La fase de división celular se completa en las semanas siguientes a antesis. De esta forma, en melocotonero consume 3-4 semanas (Ragland, 1934), 3-4 en manzano, 4-9 en naranjo y 6-8 en peral (Crane, 1964), aunque en algunos frutales puede extenderse durante mucho más tiempo. Así, en aguacate, las divisiones celulares tienen lugar a lo largo de toda la vida del fruto (Schroeder, 1953). En albaricoquero dura unos 15 días (Jackson y Coombe, 1966).

En frutales, el crecimiento del ovario desde antesis hasta la madurez, al representar la evolución del volumen o peso en función del tiempo, suele seguir una curva sigmoideal, sencilla en manzano, peral, nogal, avellano, pacanero, naranjo y aguacate, doble en los frutales de hueso, zarzamora, frambueso, grosellero, arándano, pistachero, higuera, vid y olivo, y triple en kiwi (Coombe, 1976; Stephenson, 1981; Westwood, 1982). La principal diferencia entre estas formas de crecimiento radica en que, en los frutos con endocarpio leñoso, durante la fase de engrosamiento celular, se produce una parada en el crecimiento durante dos o tres semanas, que es el tiempo empleado en la formación del hueso. A esta parada en el crecimiento le precede una etapa de crecimiento muy rápido, y una vez formado el hueso se reanuda el crecimiento hasta la maduración (Connors, 1920, citado en Jackson y Coombe, 1966; Harrold, 1935).



1 3 3. Caída de frutos

Desde la antesis hasta la maduración del fruto, se producen una serie de caídas prematuras de flores y frutos. En melocotonero hay 3 caídas importantes: la primera ocurre dentro de las dos semanas siguientes a antesis y parece ser de flores no fecundadas; la segunda se produce tras el cuajado inicial, cayéndose pequeños frutos ya fecundados, y finalmente, la tercera ocurre inmediatamente antes de la madurez y se trata de frutos ya de tamaño definitivo pero inmaduros (Harrold, 1935).

La caída de flores y frutos no es un proceso privativo de los frutales, ya que en muchas especies vegetales se producen más flores que frutos, desconociéndose todavía cuales son los mecanismos que regulan esta reducción (Charlesworth, 1989a). Sin embargo, hay indicios que apuntan a un esclarecimiento de estas causas, ya que en la fase que va de polinización a fecundación se produce una intensa interacción entre el gametofito masculino y el esporofito (Herrero y Hormaza, 1996) que es fuente de variación del porcentaje de cuajado. Así, existen mecanismos de control que favorecen el éxito de la fecundación y otros que lo dificultan (Herrero, 1992b). Esta interacción entre el gametofito masculino y el esporofito engloba una serie de procesos que reducen la población de óvulos (Herrero, 1992a).

Los días inmediatamente posteriores a la antesis cobran gran importancia, pues no sólo tiene lugar la fase progámica, que desemboca en la formación del embrión y el cuajado del fruto, sino que también se establece el número final de células que condicionará el tamaño final del fruto.

El establecimiento de las curvas de crecimiento y de caída de frutos en albaricoquero permitiría establecer la conexión entre los principales picos de caída y el desarrollo del fruto así como la relación entre los mecanismos que se producen en el interior de la flor con el cuajado y el inicio del desarrollo del fruto.

Junto a la interacción polen-pistilo y los condicionantes externos, otros factores intrínsecos a la flor podrían jugar un papel importante en el proceso de fructificación en albaricoquero. Así, las reservas acumuladas en el árbol deben desempeñar un papel clave en el desarrollo de la flor y en el inicio de la formación del fruto, ya que estos procesos tienen lugar en una fase en la que el árbol todavía no ha emitido las hojas.

1.4 FOTOASIMILADOS Y RESERVAS

Los carbohidratos son los principales constituyentes de las plantas, representando cerca de tres cuartas partes del peso seco en las plantas leñosas (Kozłowski, 1992). Se producen como resultado de la fotosíntesis, y, mientras que parte de ellos forman la estructura de la planta, los carbohidratos no estructurales tienen importantes funciones metabólicas: la mayor parte son usados directamente en el crecimiento, otra cantidad considerable se oxida en la respiración, algunos son expulsados como productos de desecho y una fracción se acumula como reserva (Chapin *et al.* 1990).

1.4.1. Las reservas en las plantas leñosas

Las plantas leñosas almacenan reservas durante los períodos de actividad fotosintética y las usan cuando la demanda de la planta no es cubierta directamente por la fotosíntesis. En los árboles de hoja perenne esto sucede en regiones donde los inviernos son demasiado fríos para realizar la fotosíntesis (Loescher *et al.*, 1990) y en los de hoja caduca, para el crecimiento y la respiración antes de la emisión de hojas (Oliveira y Priestley, 1988). Las reservas de carbohidratos juegan un importante papel en el metabolismo, crecimiento, defensa, resistencia al frío y otros factores ambientales (Kozłowski, 1992). En las plantas leñosas, el almidón es la reserva más importante (Chapin *et al.*, 1990). Se trata de un carbohidrato insoluble, que no es capaz de pasar como tal de célula a célula y que se sintetiza en aquellos tejidos donde se encuentra por la condensación de cientos de moléculas de glucosa. Su almacenamiento ocurre en plástidos, previniendo así su degradación al aislarse de las rutas metabólicas (Chapin *et al.*, 1990). En las plantas leñosas no existe un órgano específico de almacenamiento (Kandiah, 1979), por lo que todas las partes del árbol almacenan reservas en mayor o menor medida. Aunque cada especie acumula reservas de distinta forma (Abod y Webster, 1991), en general las concentraciones más altas de carbohidratos no estructurales se encuentran en las raíces (Loescher *et al.*, 1990). El almidón se encuentra claramente implicado en diferentes actividades de la vida de la planta, tales como la germinación de la semilla (Dennis *et al.*, 1982), fotosíntesis (Roper *et al.*, 1988), proceso reproductivo (Arbeloa y Herrero, 1991) y funciones de almacenamiento (Smith *et al.*, 1995), y

el seguimiento de los cambios en el contenido de almidón es un fiel reflejo de los cambios fisiológicos.

1 4 2. Reservas y fructificación

La importancia de las reservas es determinante en la vida de las plantas leñosas en general y en el crecimiento de los órganos reproductivos en particular (Oliveira y Priestley, 1988), existiendo evidencias de que el almidón almacenado previamente sustenta el crecimiento de los frutos en las fases iniciales de desarrollo (Krabel, 1992). De la misma forma, la disponibilidad de carbohidratos almacenados es el factor más importante en el proceso de división celular del pericarpio (Jackson y Coombe, 1966), y estas reservas podrían condicionar el proceso reproductivo (Charlesworth, 1989b), así como la calidad y rendimiento de la cosecha (Keller y Loescher, 1989). Sin embargo, las implicaciones de las reservas en la iniciación floral, el desarrollo de la flor y el fruto todavía no están bien establecidas (Loescher *et al.*, 1990). En los frutales de hueso, la floración tiene lugar antes que la emisión de hojas. Por ello, la flor sólo se nutre de las reservas acumuladas por el árbol antes del reposo. Sin embargo, importantes acontecimientos ocurren en esta fase, produciéndose la fecundación y el inicio de la fructificación. Las reservas que sustentan estos procesos deben encontrarse en la madera o en la propia flor. Para la evaluación de esta última hipótesis, sería necesario determinar el contenido de reservas de las flores.

1 4 3. Reservas en la flor y calidad de flor

El hecho de que la degeneración de los óvulos esté asociada a la falta de reservas de fotoasimilados (Arbeloa y Herrero, 1991) induce a pensar que la distribución de estas reservas puede jugar un papel clave en el proceso reproductivo. Tradicionalmente se ha asumido que las reservas nutritivas del árbol juegan un papel decisivo en el nivel de fructificación. Williams en 1965 puso de manifiesto que estas reservas nutritivas afectaban el sistema reproductivo influyendo en la longevidad de los óvulos. Han pasado 30 años y cuando se trata de analizar de un modo exhaustivo cual es el principal determinante de cuajado se llega a resultados muy similares (Robbie y Atkinson, 1994). Sin embargo no se ha podido detectar el

mecanismo que conecta estos dos hechos, probablemente porque la evaluación del contenido de almidón de las flores presenta importantes dificultades. Por un lado, el uso de técnicas extractivas o bioquímicas requieren la homogeneización de las flores, por lo que se ignoran las diferencias entre las flores. Por otro lado, las reservas de hidratos de carbono se encuentran compartimentalizadas en las plantas (Watson y Casper, 1984), y el crecimiento sucede en órganos individuales de la planta (Sprugel *et al* 1991), siendo la distribución de los fotoasimilados sustancialmente diferente de un órgano importador a otro (Ho, 1988). Esta compartimentalización de las reservas de almidón es altamente especializada, tanto a nivel inflorescencia (Gutián, 1994), como a nivel de flores individuales, donde existen grandes diferencias dentro del pistilo entre grupos de células próximos (Arbeloa y Herrero, 1991). Ni los métodos extractivos ni las técnicas bioquímicas son capaces de detectar estas variaciones en pequeñas partes de la planta. Por ello, sería necesario realizar un seguimiento flor a flor y tejido a tejido. La combinación de técnicas histoquímicas con análisis de imagen puede ser una alternativa válida, no sólo para observar la presencia o ausencia de almidón, sino para cuantificar su contenido, permitiendo hacer comparaciones entre diferentes grupos de células o individuos.

Las producciones irregulares son uno de los principales limitantes de la producción frutal. Estas oscilaciones se han asociado tradicionalmente con factores climáticos adversos, principalmente heladas y bajas temperaturas y lluvias durante el período de floración. Sin embargo, cuando se ha intentado establecer una relación entre estos factores climáticos y las producciones, los resultados han puesto de manifiesto que estos elementos no podían explicar satisfactoriamente las variaciones observadas (Jackson y Hamer, 1980) y que la principal fuente de variación se debía a algo inherente a la flor, que era desconocido, pero que se denominó "calidad de flor" (Goldwin, 1981). Sin embargo, todavía se desconoce qué es y qué lo determina.

La determinación de los niveles de reservas de almidón en distintas estructuras de la flor mediante la combinación de técnicas histoquímicas con análisis de imagen y su implicación tanto en el proceso de degeneración de óvulos como en el inicio de la fructificación y el cuajado, puede abrir un camino para conocer y determinar el concepto de "calidad de flor".

1.5. CONCLUSIONES DE LA REVISION

El albaricoquero es un cultivo tradicional en Aragón que sufrió una importante recesión en la década de los 80, debida a las bajas producciones. En los últimos años hay un interés creciente en recuperar el cultivo, fundamentalmente el cultivar Moniquí, debido a la excelente calidad de sus frutos. Sin embargo, se trata de un cultivar que presenta graves problemas de producción ocasionados por la falta de cuajado. La localización de los cuellos de botella productivos en esta especie permitiría el manipularlos, especialmente en éste y otros cultivares que ya tienen un nicho comercial establecido. Por otro lado, un conocimiento de la biología reproductiva de esta especie delimitaría un marco en el que poder estudiar la causa de la marcada zonalidad que presentan la inmensa mayoría de los cultivares de albaricoquero actualmente cultivados.

El nivel de cuajado podría estar regulado en el interior de la flor, y el pistilo parece albergar los mecanismos que controlan esta regulación, incluyendo el sistema de incompatibilidad y los mecanismos que reducen la población de óvulos, sin que se conozcan las causas que provocan esta situación. Además de las relaciones de compatibilidad, la interacción polen - pistilo y los condicionantes externos, otros factores, como el estado nutritivo de la flor, podrían jugar un papel importante en el proceso de fructificación.

En esta tesis se plantea el estudio de qué es la calidad del flor y cual es su efecto en el cuajado de fruto en el cultivar de albaricoquero Moniquí. Para ello se ha caracterizado el proceso de desarrollo de la flor y del fruto, haciendo hincapié en la fase comprendida entre la polinización y la fecundación y relacionándola con el estado nutritivo de la flor, que podría ser determinante en esta fase, ya que en ella se forma el embrión, se establece el cuajado inicial y se establece el número final de células, lo que condicionará el tamaño del fruto. Los resultados se han analizado en base al comportamiento del árbol en el campo.

1.6. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es el estudio de la calidad de flor y su incidencia en el cuajado de fruto en albaricoquero. Para ello, por una parte, se caracteriza tanto el desarrollo de la flor como el cuajado y la fructificación y, por otra, se valora la incidencia que tiene el estado nutritivo de las flores en estos procesos.

Objetivo 1. Desarrollo floral. Caracterización del proceso de desarrollo floral desde el desborre hasta el cuajado inicial del fruto.

- Diferenciación floral desde la iniciación floral hasta la floración
- Fase comprendida entre polinización y fecundación.

Objetivo 2. Cuajado y fructificación. Caracterización del cuajado y la fructificación en campo y evaluación de las implicaciones de las relaciones de compatibilidad en el cuajado inicial.

- Efectos de la polinización en el cuajado de 'Moniquí'
- Crecimiento y caída de frutos

Objetivo 3. Estado nutritivo de la flor. Valoración del estado nutritivo de las flores y evaluación de su influencia en el desencadenamiento tanto del proceso de fecundación como del de fructificación.

- Evaluación del contenido de almidón en pequeñas estructuras mediante la combinación de técnicas histoquímicas con análisis de imagen
- Efecto del estado nutritivo del óvulo en la fecundación
- Efecto del estado nutritivo de la flor en la fructificación

2. DIFERENCIACION FLORAL

2. DIFERENCIACION FLORAL

2.1. INTRODUCCION

El primordio floral en *Prunus*, antes de la entrada en reposo, se encuentra en un estado de desarrollo en el que el pistilo, los pétalos, sépalos y anteras están ya diferenciados (Tufts y Morrow, 1925; citado en Westwood, 1982). Sin embargo, el estado de desarrollo en el que se encuentran las yemas fructíferas al inicio del reposo depende de distintos factores. En albaricoquero, el agua aportada en los meses de verano juega un importante papel en el desarrollo de las yemas (Brown, 1953). Un estrés hídrico en esas fechas retrasa la diferenciación y el desarrollo floral, provocando una disminución en el tamaño de los frutos y un retraso en la maduración de hasta tres semanas. La falta de agua en verano también prolonga el estado de reposo (Brown, 1952, 1953) y reduce la diferenciación de yemas fructíferas. En otras especies el estrés hídrico también se ha asociado a la caída de yemas (Goldwin, 1992), fenómeno que también se produce al no cubrirse las necesidades de frío invernal, que en albaricoquero oscilan entre 350 y 1100 horas por debajo de 7°C según cultivares (Tabuenca, 1967) o bien por otros factores, como bajos niveles de luz, temperaturas demasiado bajas o exceso de agua (Goldwin, 1992). En condiciones favorables de riego, al llegar las yemas al reposo se encuentran no sólo con todas las partes de la flor perfectamente distinguibles, sino con los óvulos y las células madre del polen también apreciables (Brown, 1953).

El hecho de que no todas las yemas llegan al reposo en el mismo estado de desarrollo llevó a pensar que estas diferencias podrían explicar los diferentes requerimientos varietales de horas frío. No obstante, en un mismo cultivar, las yemas menos desarrolladas no requieren distinto número de horas de frío que las más avanzadas, por lo que su estado de diferenciación no puede ser usado como índice de "intensidad" del reposo en albaricoquero (Brown y Abi-Fadel, 1953). Durante el reposo, el desarrollo de las yemas se ralentiza, fundamentalmente en el inicio del invierno (Brown y Kotob, 1957), para reanudarse en las semanas previas al desborre. Aunque en este período no hay cambios importantes en el desarrollo morfológico de la flor, sí tienen lugar importantes cambios a nivel celular. Así, en *Prunus cerasus*, coincidiendo con el período en el que el árbol cubre sus necesidades de frío, se forman numerosos granos de almidón en distintos tejidos de la yema de

flor (Felker *et al.*, 1983).

Con el objetivo de caracterizar el proceso de diferenciación floral desde la iniciación floral hasta el cuajado del fruto, en primer lugar se ha seguido el proceso de desarrollo de yemas fructíferas en el cultivar Moniquí, desde la caída de hojas hasta la floración. Igualmente, a lo largo de cuatro años, se ha realizado un seguimiento de los estados fenológicos tanto en 'Moniquí' como en otros tres cultivares de albaricoquero, 'Búlida', 'Canino' y 'Paviot', estableciéndose las épocas de floración de los cuatro cultivares.

2.2. MATERIAL Y METODOS

2.2.1 Material vegetal

Las observaciones han sido realizadas durante el período 1993-1996 sobre tres árboles de cada cultivar, utilizando los clones 'Búlida' 2765 sobre 'Mirobolán GF31', y 'Canino' 2096, 'Moniquí' 2213 y 'Paviot' 2148 sobre 'Mirobolán B', todos ellos dentro de la colección de cultivares de la EE Aula Dei (Estación Experimental de Aula Dei) en Montañana (Zaragoza). Se trata de árboles de 15 años formados en vaso, con un marco de plantación de 3 x 5 m.

2.2.2 Fenología de la diferenciación floral

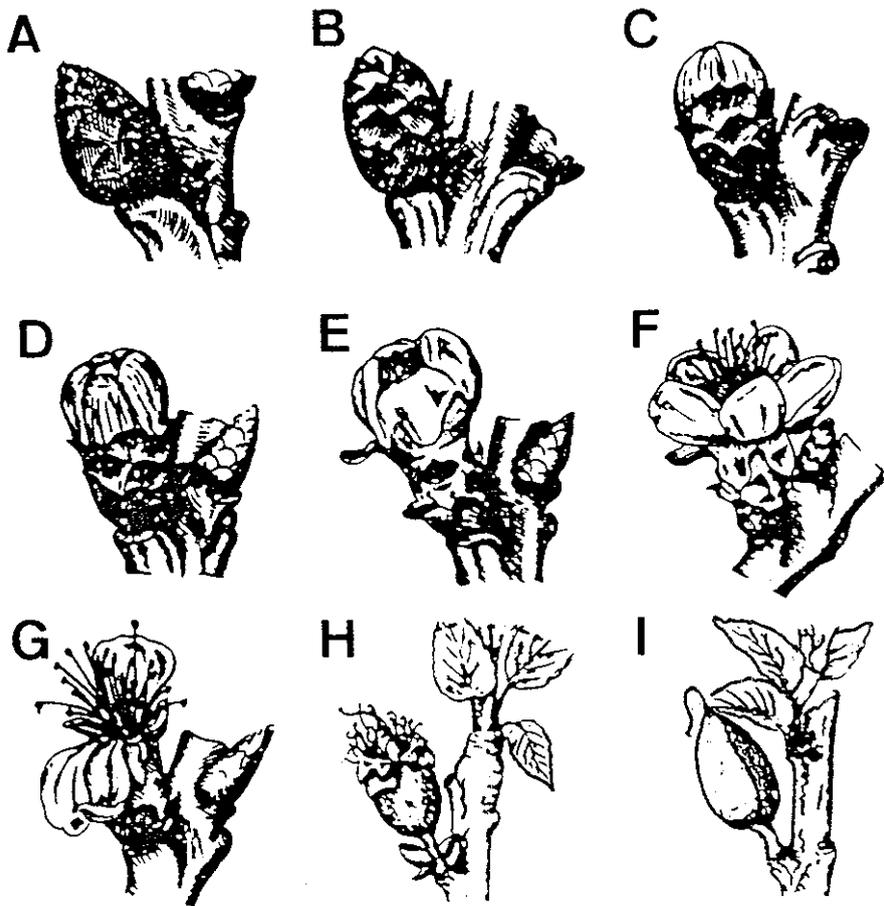
Para el seguimiento fenológico desde la iniciación floral hasta el desborre, se ha utilizado la sistemática propuesta por Brown (1953) para albaricoquero:

- 0 Sin evidencia de diferenciación
- 1 Primordios de sépalos y pétalos evidentes.
- 2 Primordios de sépalos y pétalos más avanzados; estambres y pistilo apreciables
- 3 Las partes de la flor claramente distinguibles. Anteras sin tejido esporógeno
- 4 Todas las partes de la flor más avanzadas. Anteras con tejido esporógeno.
- 5 Pistilo con óvulos apreciables. Anteras con células madres del polen.
- 6 Pistilo y óvulos más grandes. Células madres del polen maduras.
- 7 Aumento de tamaño de óvulos y pistilo. Tétradas en anteras
- 8 Óvulos bien desarrollados. Granos de polen maduros

2.2.3 Fenología de la floración

Para el seguimiento de los estados fenológicos desde el reposo hasta el engrosamiento del fruto, se han seguido los estados tipo de Baggiolini (1952) (Fig. 2.1).

Para la determinación de la época de floración, como comienzo de la misma se ha considerado la fecha en que las primeras flores alcanzan el estado F, la floración plena cuando la mayoría de las flores se encuentran en dicho estado F y final de la floración cuando caen los pétalos de las flores más atrasadas.



- A** Yema de invierno. Totalmente cerrada, oscura y puntiaguda
B La yema comienza a redondearse, con una coloración más clara
C La yema se hincha, se alarga y deja aparecer los sépalos rojos
D Los sépalos se entreabren y permiten ver la corola blanca
E La yema se abre parcialmente, apareciendo los estambres.
F Flor abierta. Los pétalos están completamente abiertos.
G Los pétalos caen, enrollándose los estambres
H El ovario engrosa y rechaza hacia la parte superior el collarín seco del cáliz.
I Fruto tierno, que expulsa al crecer el collarín del cáliz.

Figura 2.1: Estados fenológicos de la floración de albaricoquero según Baggiolini (1952)

2.3 RESULTADOS

El seguimiento de las yemas florales del cultivar 'Moniquí', desde la caída de hojas hasta la salida del reposo (Fig. 2.2) muestra que, en Octubre, antes de la entrada en reposo (Fig. 2.2a), las yemas tienen ya todas las partes florales bien diferenciadas (Fig. 2.2b), correspondiéndose con los estados 3 y 4 de Brown. El aspecto de las yemas de flor al entrar y al salir del reposo (Fig. 2.2c y 2.2d) es similar tanto exterior como interiormente, por lo que no parece haber cambios morfológicos durante el reposo (Fig. 2.2a-2.2d), encontrándose los estambres y el pistilo ya formados. En ocasiones aparecen yemas con dos pistilos (Fig. 2.2e), aunque lo más común es la presencia de un único pistilo (Fig. 2.2f). A la salida del reposo, los cambios se aceleran, creciendo todas las estructuras con rapidez (Fig. 2.3) y coincidiendo con un engrosamiento general de la yema (estado B). A mediados de Febrero la yema alcanza el estado C (Fig. 2.3a y 2.3b), dejando ver los sépalos y mostrando un mayor desarrollo del pistilo. Una semana más tarde, la yema, aún permaneciendo en estado C, muestra al seccionarla los pétalos claramente desarrollados, junto con una elongación apreciable del estilo (Fig. 2.3c y 2.3d). A los pocos días los pétalos son visibles, y el estilo alcanza su longitud definitiva en el estado D (Fig. 2.3e y 2.3f). Este estado de botón globoso dará lugar, tras unas horas en estado E, a la antesis, con la flor totalmente abierta (Estado F), los granos de polen ya maduros y el estigma receptivo.

El pistilo experimenta intensos cambios durante el desarrollo de la yema, tanto interior como exteriormente (Fig. 2.4). Al inicio del estado C, el pistilo presenta tricomas en la base del estilo (Fig. 2.4a), mientras que, en los óvulos, los tegumentos recubren la mayor parte de la nucela (Fig. 2.4b). Pocos días más tarde, durante el mismo estado C, se produce una rápida elongación del estilo (Fig. 2.4c), acompañada por un considerable aumento de tamaño de los óvulos, en los que la nucela se encuentra totalmente cubierta por los tegumentos (Fig. 2.4d). En el estado D se completa el crecimiento del estilo, mientras que los óvulos continúan su desarrollo (Fig. 2.4e y 2.4f).

El seguimiento de los distintos estados fenológicos de los 4 cultivares durante los 4 años estudiados, tanto de la época de inicio como de la duración de los mismos, muestra el temprano desarrollo de las yemas y su susceptibilidad a sufrir daños por las heladas primaverales, como ocurrió en el año 1995 (Fig. 2.5).

El período de floración de los cultivares estudiados, durante el período 1993-1996, comenzó en un intervalo comprendido entre finales de Febrero en la más precoz, 'Canino', hasta la primera semana de Marzo en 'Búlida', produciéndose la plena floración en todos los cultivares en la primera quincena de Marzo y finalizando en la última semana de Marzo (Fig 2.6)

La emisión de hojas es posterior a la floración, por lo que el albaricoquero es una especie histeranta. En 'Moniquí', cuando la mayor parte de las flores se encuentran en estado G, hacia mediados de Marzo, las primeras hojas tienen el tamaño de los pétalos de las flores, no llegando a alcanzar su tamaño definitivo hasta el mes de Abril, al menos un mes después del inicio de la floración. Por otro lado, la caída de hojas comienza a finales de Octubre o principios de Noviembre, completándose por término medio a mediados de Diciembre.

Figura 2.2

Figura 2.2: Fenología del cultivar Moniquí desde la caída de hojas hasta la salida del reposo.

- (a) Yema de flor en estado A antes de la entrada en reposo, totalmente cerrada y de color oscuro. Barra = 2 mm.
- (b) Sección de la yema anterior, mostrando el pistilo y las anteras diferenciadas. Barra = 0,4 mm.
- (c) Yema de flor en estado A, a la salida del reposo, mostrando un aspecto similar al que presentan las yemas antes del reposo. Barra = 1 mm.
- (d) Sección de la yema anterior, mostrando un estado de desarrollo similar al de las yemas antes del reposo. Barra = 0,3 mm.
- (e) Dos pistilos en una sola yema a la salida del reposo. Barra = 0,3 mm.
- (f) Pistilo de una yema en estado B. Los tricomas comienzan a formarse en la base del estilo. Barra = 0,3 mm.

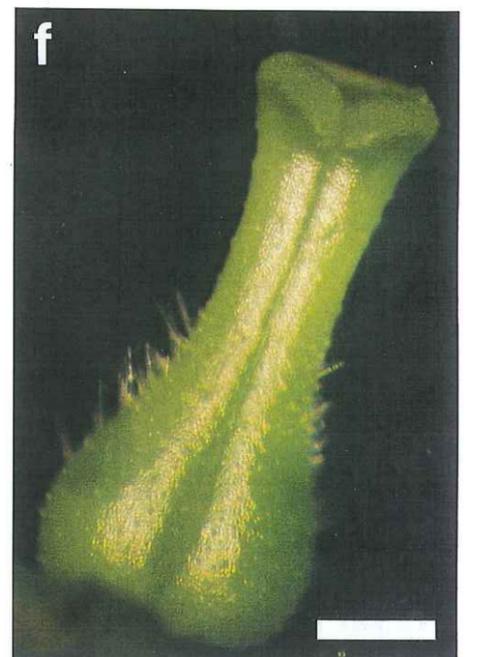
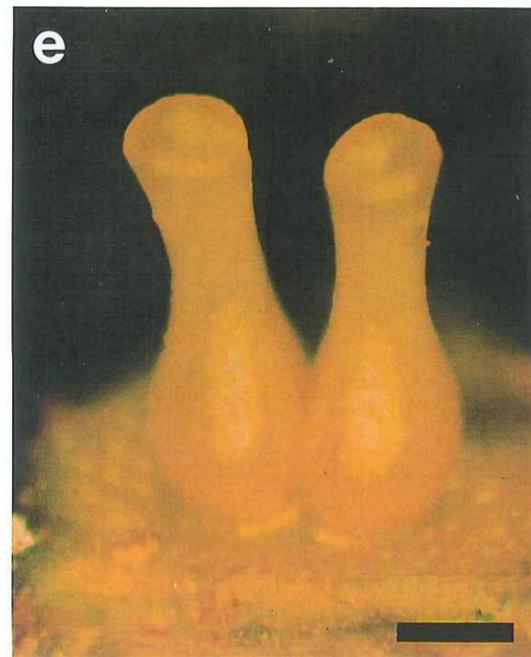
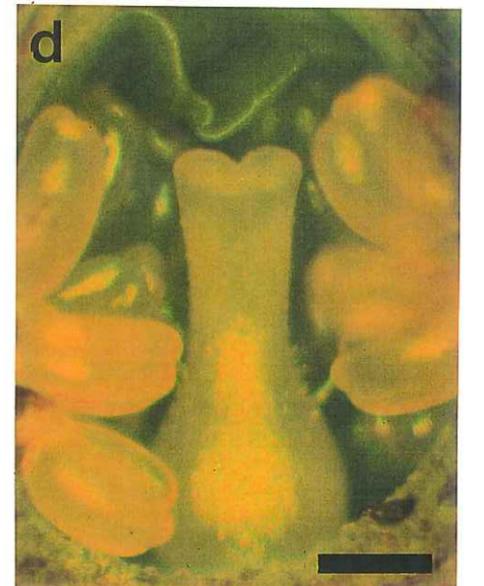
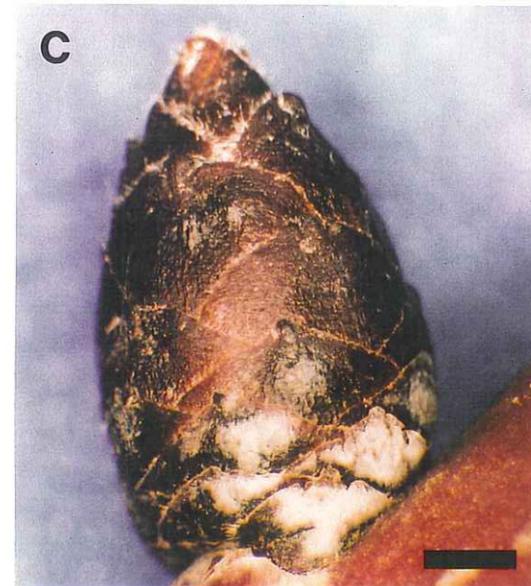
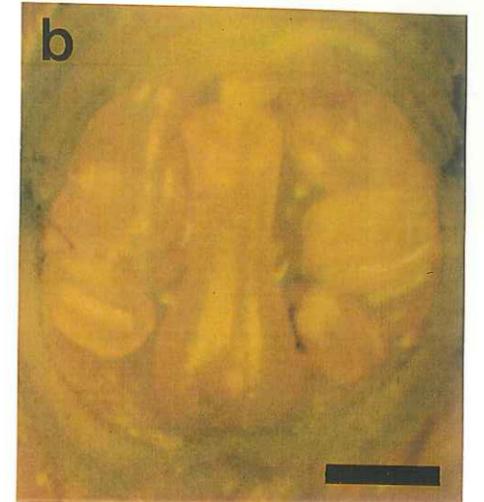
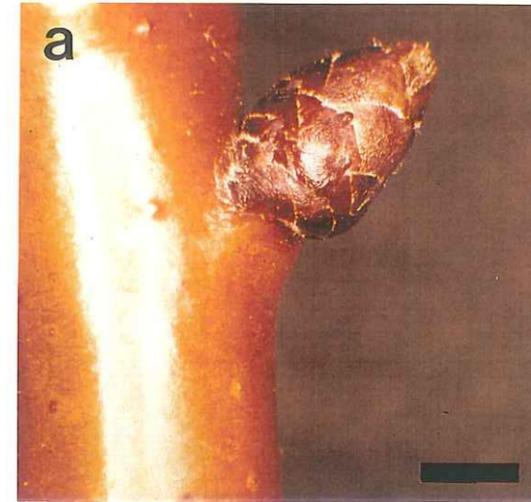


Figura 2.3: Fenología del cultivar Moniquí desde el desborre hasta el estado de botón globoso.

- (a) Yema de flor en el inicio del estado C. En el extremo de la yema se aprecian los sépalos rojos. Barra = 1 mm.
- (b) Sección de la yema anterior. El pistilo presenta tricomas en la base del estilo. Barra = 1 mm.
- (c) Yema de flor en estado C una semana después de la anterior. Los sépalos continúan emergiendo, ocupando la mitad de la longitud de la yema. Barra = 1,5 mm.
- (d) Sección de la yema anterior, mostrando los pétalos claramente desarrollados y una elongación apreciable del estilo. Barra = 1,5 mm.
- (e) Yema de flor en estado D. Los sépalos rojos se abren dando paso a los pétalos blancos. Barra = 2 mm.
- (f) Sección de la yema anterior. El estilo y los estambres se encuentran totalmente desarrollados. Barra = 2 mm.

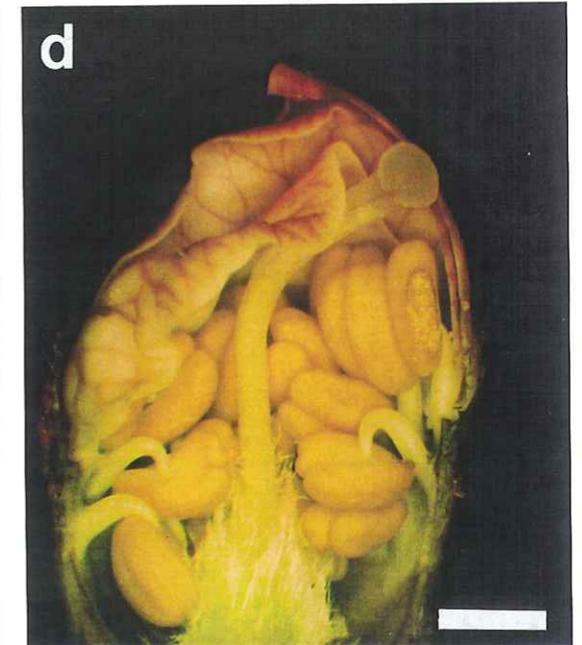
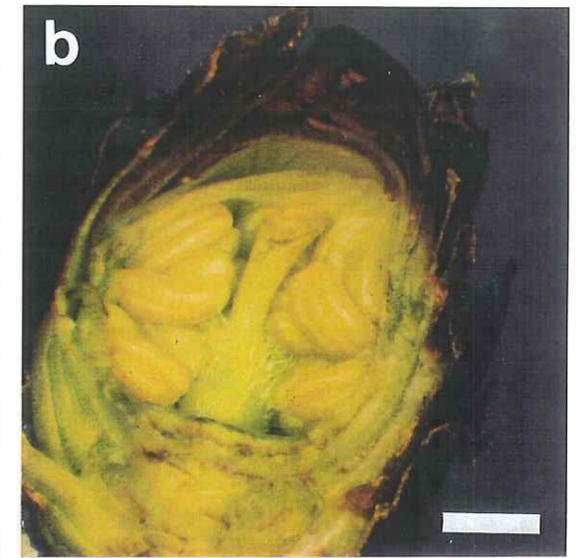
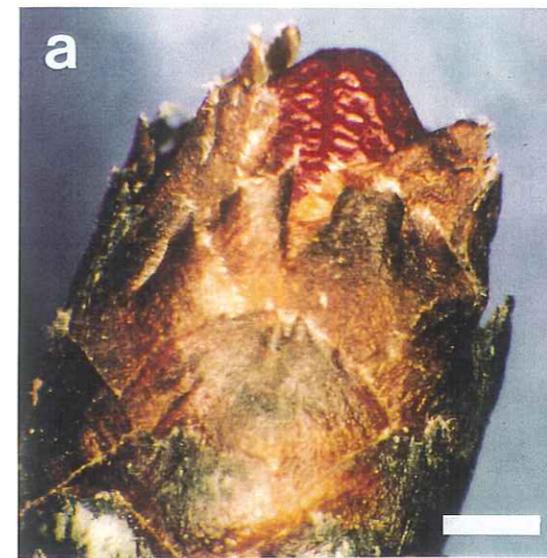
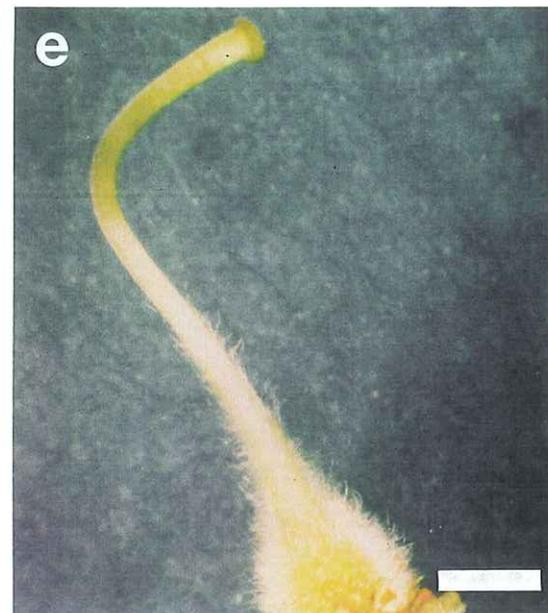
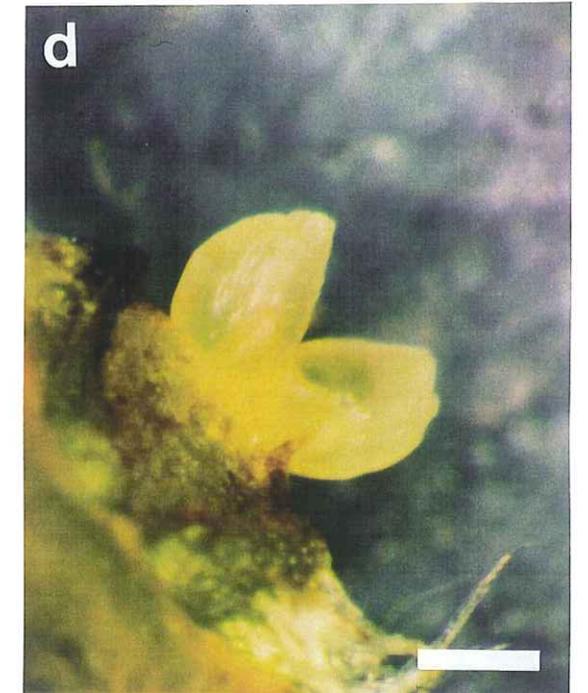
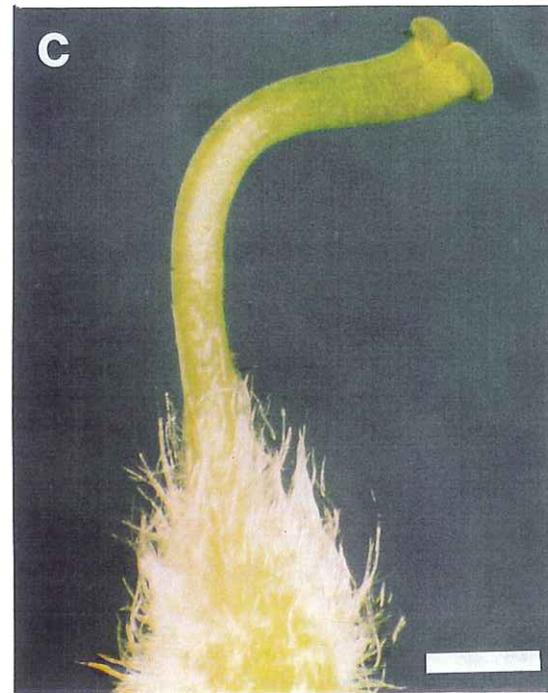
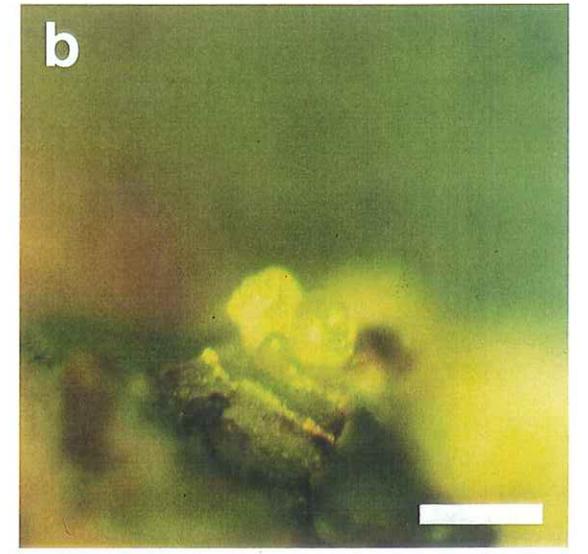
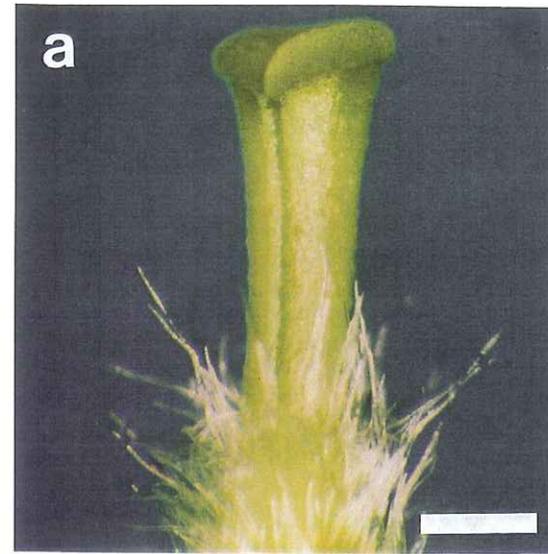


Figura 2.4: *Desarrollo del pistilo en el cultivar Moniquí.*

- (a) Pistilo en el inicio del estado C, con tricomas completamente desarrollados en el ovario y en la base del estilo. Barra = 0,4 mm.
- (b) Ovulos en el inicio del estado C. Los tegumentos cubren parcialmente la nucela. Barra = 0,3 mm.
- (c) Pistilo en estado C. El estilo comienza a alargarse. Barra = 1 mm.
- (d) Estado de los óvulos en estado C. Los tegumentos cubren totalmente la nucela. Barra = 0,3 mm.
- (e) Pistilo en estado D. El estilo ha alcanzado su longitud definitiva mientras que el ovario aparece más redondeado que en el estado anterior. Barra = 2 mm.
- (f) Ovulos en estado D, con un aumento espectacular de tamaño desde el estado anterior. Barra = 0,3 mm.



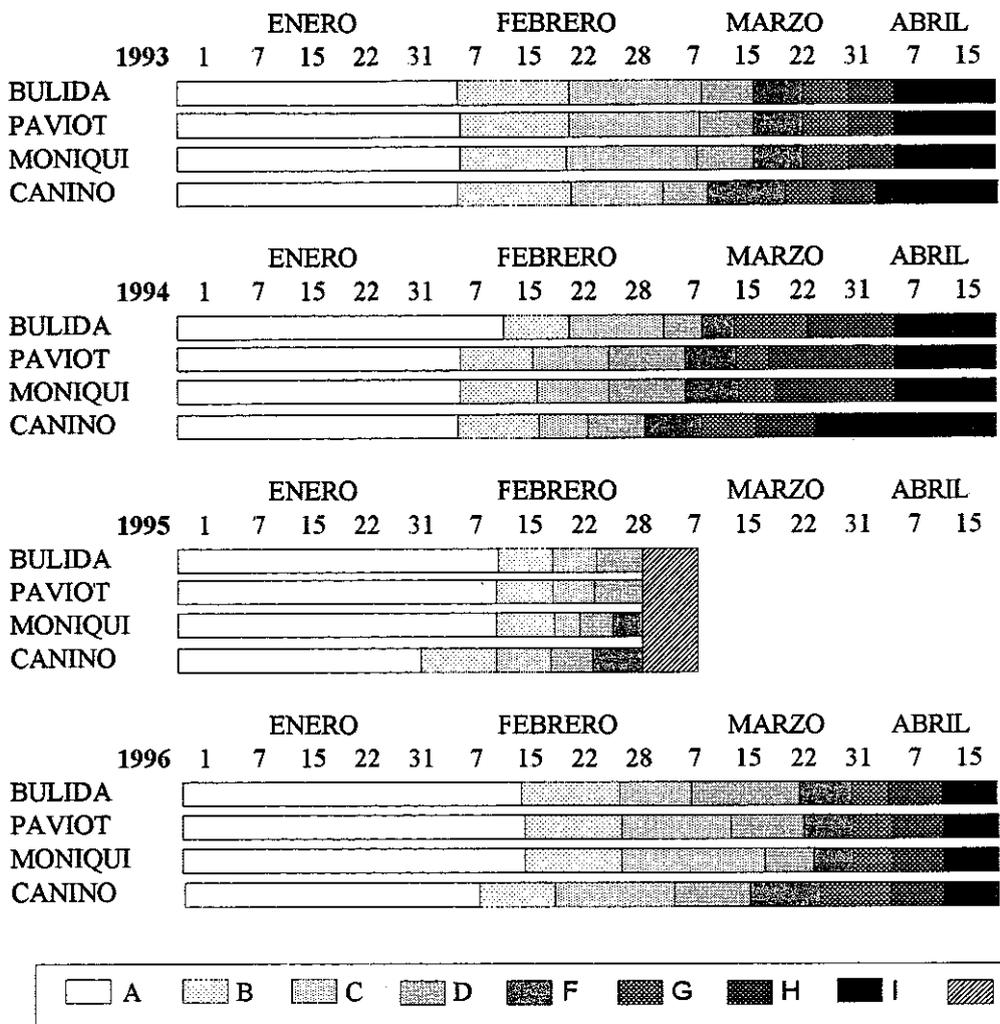


Figura 2.5: Estados fenológicos de cultivares de albaricoquero durante el período 1993-1996 en la EE Aula Dei (Zaragoza).

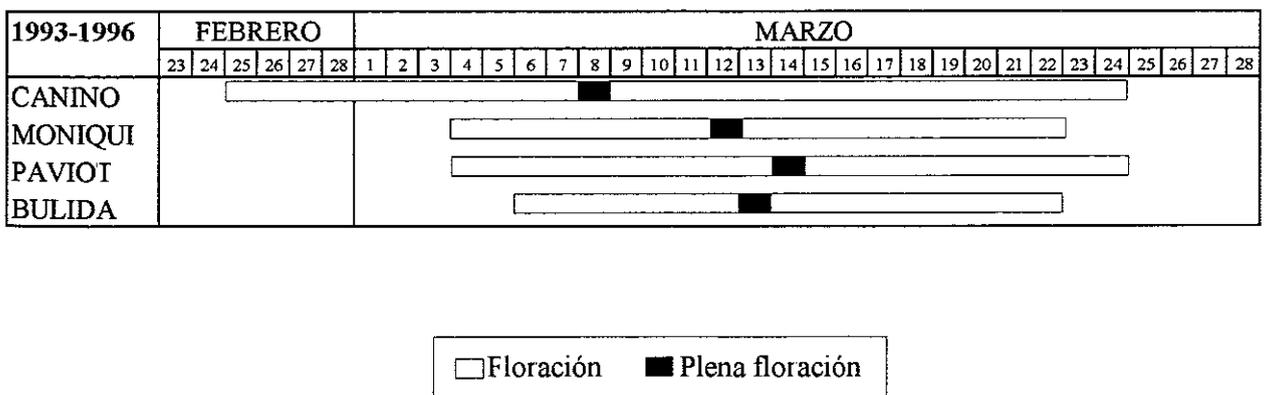


Figura 2.6: Período de floración medio de cultivares de albaricoquero durante el período 1993-1996 en la EE Aula Dei (Zaragoza)



2.4. DISCUSION

El orden de floración de los cultivares estudiados coincide con el mostrado por los mismos en trabajos anteriores (Herrero y Tabuenca, 1966), aunque globalmente la floración fue más temprana en el período 1993-1996. Este hecho fue debido a que en los años 1994 y 1995 las temperaturas en el período anterior a la floración fueron anormalmente altas, y muestra la variación que puede existir en el comportamiento de un cultivar de un año a otro, lo que a menudo provoca la pérdida de gran parte de la cosecha como consecuencia de las heladas de primavera, como ocurrió en el año 1995. Esta sensibilidad a las heladas primaverales junto a la susceptibilidad a *Monilia* son importantes condicionantes de la producción de 'Moniquí' (Escudero y Rodríguez Navarro, 1990).

En numerosas ocasiones, se ha observado la presencia de pistilos dobles, carácter frecuente en el género *Prunus* (Sterling, 1964), que da lugar a frutos dobles, que son de escaso o nulo valor comercial. En otras especies de *Prunus*, este hecho se ha asociado a temperaturas excesivamente altas durante el período de diferenciación (Westwood, 1982).

Cada una de las fases de desarrollo de las yemas desempeña una importante función en el desarrollo global de la flor. Entre la iniciación floral y el reposo, la situación nutritiva del árbol tiene una clara repercusión en el período de viabilidad de los óvulos en la primavera siguiente (Williams, 1965). Durante el período de reposo se detiene el desarrollo morfológico, aunque se pueden producir cambios en el metabolismo de las yemas (Brown y Kotob, 1957; Felker *et al.*, 1983). Para el reanudamiento del crecimiento en primavera es necesario que se cubran las necesidades de frío, produciéndose, sino se completan, anomalías en la emisión de flores y hojas, en el cuajado e incluso en el crecimiento de los frutos (Erez, 1987; Sedgley y Griffin, 1989). El número de horas de frío necesarias para salir del reposo es un carácter que parece estar controlado genéticamente, teniendo cada especie y cada cultivar unas necesidades determinadas (Saure, 1985). Este fenómeno parece estar regulado hormonalmente (Sedgley y Griffin, 1989), aunque se desconocen las causas fisiológicas que intervienen en el proceso. En *Prunus cerasus*, durante el reposo, coincidiendo con el período en que se cubren los requerimientos de frío, se sintetiza el almidón que se encuentra presente en la yema en el momento del desborre (Felker *et al.*, 1983). En las yemas de flor de *Rhododendron*, el

almidón se acumula antes del reposo, permaneciendo intacto hasta la primavera (Schneider, 1972) Dentro de los múltiples factores que intervienen en el proceso del reposo el metabolismo de los carbohidratos juega un importante papel en el desarrollo de las yemas de flor (Felker *et al.*, 1983). Las anomalías que se producen en la floración cuando no se cubren los requerimientos de frío podría estar relacionado con la falta de almidón en las yemas.

El período comprendido entre el desborre y la emisión de hojas parece desempeñar un importante papel en el proceso reproductivo, dados los espectaculares cambios observados en las yemas y flores. Durante los estados C y D, en un corto espacio de tiempo tiene lugar la aparición de tricomas en la base del estilo y la parte superior del ovario, la elongación del estilo y un pronunciado aumento de tamaño de los óvulos. El rápido desarrollo de los óvulos observado en los días previos a la floración puede guardar relación con el hecho de que, en anthesis, el saco embrionario se encuentra inmaduro en peral (Herrero y Gascón, 1987), melocotonero (Arbeloa y Herrero, 1991), manzano (Costa Tura y Mac Kenzie *et al.*, 1990) y albaricoquero (Burgos y Egea, 1993; Burgos *et al.*, 1995) Al no haber hojas o no ser fotosintéticamente activas, estos cambios y los necesarios para completar el desarrollo de la flor deben estar sustentados por las reservas del árbol, aunque los mecanismos que regulan este proceso no se conocen con exactitud (Marshall y Watson, 1992)

Una vez caracterizado el desarrollo de la flor en el campo, el siguiente paso va a ser estudiar el proceso en el interior de la misma, prestando especial atención a la fase comprendida entre la polinización y la fecundación, ya que, a diferencia de los frutales de pepita, los frutales de hueso no desarrollan frutos partenocárpicos, por lo que al menos uno de los dos óvulos necesita ser fecundado para que se complete el desarrollo del fruto.

3. DE POLINIZACION A FECUNDACION

3 DE POLINIZACION A FECUNDACION

3.1. INTRODUCCION

La fase comprendida entre la polinización y la fecundación encierra una intensa interacción entre los tubos polínicos y el pistilo, cuyo resultado final es la formación del embrión. Por un lado, las distintas estructuras pistilares sirven de apoyo tanto a nivel nutricional como direccional de los tubos polínicos en su camino hacia el óvulo (Herrero y Hormaza, 1996), mientras que la polinización induce la secreción estigmática (Herrero y Arbeloa, 1989; Herrero, 1992a) y afecta al desarrollo del saco embrionario (Herrero y Gascón, 1987; Arbeloa y Herrero, 1991; Burgos y Egea, 1993). En otras especies del género *Prunus*, la fase progámica ha sido descrita con detalle. Así, en melocotonero, mientras que los tubos polínicos comienzan a llegar a la base del estilo 7 días después de la germinación del polen en el estigma, la fecundación no tiene lugar hasta 12 días después. Los tubos sufren una parada de 5 días en su crecimiento al llegar al obturador y otra de 3 días antes de entrar en el óvulo (Herrero y Arbeloa, 1989). Paralelamente, los óvulos completan su desarrollo o degeneran (Arbeloa y Herrero, 1991). Sin embargo, se desconoce hasta qué punto los mecanismos descritos en esta especie son comunes a todo el género.

Con el objetivo de caracterizar en el interior de la flor de albaricoquero cv Moniquí la fase comprendida entre la polinización y la fecundación, se ha llevado a cabo un estudio de este proceso, valorando la cinética de los tubos polínicos en su paso a través del pistilo.

3.2. MATERIAL Y METODOS

3.2.1. Material vegetal

Las observaciones han sido realizadas sobre flores procedentes de 3 árboles de 'Moniquí' y 3 árboles de 'Búlida' de la colección de cultivares de la EE Aula Dei en Montañana (Zaragoza) (Apartado 2.2.1)

3.2.2. Preparación del material

3.2.2.1. Establecimiento de poblaciones de flores

Se siguió el crecimiento de las flores de dos poblaciones durante 1993 y 1994, una de flores polinizadas manualmente con polen compatible y otra dejada sin polinizar. El control de las distintas poblaciones se realizó mediante la señalización de las ramas elegidas para cada una con cintas adhesivas de colores (Fig 3 1a). Con el fin de que todas flores estuvieran sincronizadas de partida, las yemas más atrasadas y las flores más adelantadas en las ramas elegidas fueron eliminadas, dejando sólo las yemas en estado D (Baggiolini, 1952) de botón globoso próximo a abrirse.

3.2.2.2. Obtención de polen

Para la obtención de polen se partió de flores de 'Canino' en estado D (Fig 3 1b). Se separaron las anteras, todavía sin dehisir, de sus filamentos y se dejaron sobre papel a temperatura ambiente durante 48 h, provocando así su dehiscencia (Fig 3.1c). Mediante una malla fina de 0,26 mm de luz se coló el polen con la ayuda de un pincel, congelándolo a -20°C hasta el momento de su utilización (Fig 3 1d).

3.2.2.3 Emasculación y polinización de las flores

Con el fin de evitar la llegada de insectos polinizadores y así poder controlar la polinización, se emascularon las flores objeto de estudio (Free, 1964). Para ello,

con la flor en estado D de botón globoso próximo a abrirse, se eliminaron manualmente anteras y pétalos dejando únicamente el pistilo (Fig. 3 1e). A las 24 h después de la emasculación, y tras mantener a temperatura ambiente durante unos minutos el polen previamente congelado, se polinizaron las flores deseadas. Para obtener una distribución uniforme del polen en la superficie del estigma, la polinización manual se realizó con la ayuda de un pincel.

3.2.3. Técnicas para el estudio de la germinación y crecimiento de los tubos polínicos

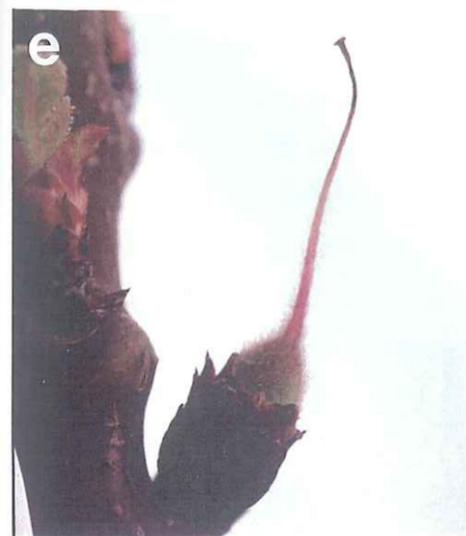
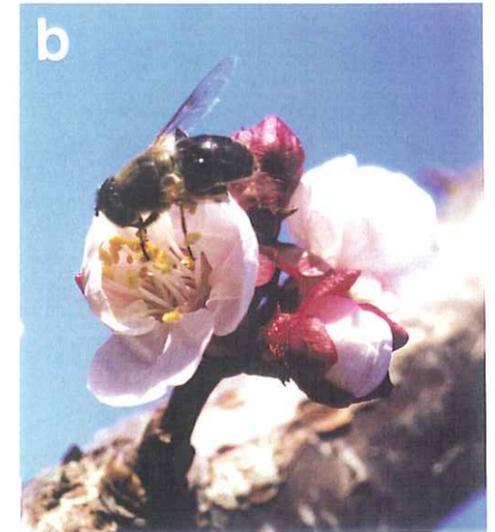
El día posterior a la emasculación de las flores se polinizaron manualmente la mitad de las flores y fue considerado día 0 para el control de las dos poblaciones. A partir de entonces se recogieron diariamente entre 10 y 15 flores de cada población durante 10 días. En el campo, las flores se introdujeron en botes herméticos con papel de filtro húmedo para evitar su desecación en el traslado al laboratorio, donde se fijaron los pistilos en FAA (70% etanol : ácido acético glacial : formaldehído [18:1:1, v/v]) (Johansen, 1940).

Por otro lado, los primeros estados de la germinación y el crecimiento de los tubos polínicos en el estigma se observaron sobre flores cortadas y colocadas sobre espuma de florista en bandejas con agua a temperatura controlada de 25°C (Fig. 3.1f). Las flores fueron emasculadas para evitar la autopolinización y polinizadas manualmente al día siguiente, fijándose en FAA a distintos intervalos de tiempo.

Para la observación al microscopio tanto de los estilos procedentes del ensayo en campo como los del ensayo de laboratorio, ambos previamente fijados en FAA y almacenados a 4°C, se lavaron en tres tiempos de una hora cada uno con agua destilada y se dejaron en sulfito sódico al 5% durante la noche. Al día siguiente se volvieron a lavar con sulfito sódico y se introdujeron en el autoclave durante 10 min a 1 Kg/cm² de presión (Jefferies y Belcher, 1974), para impedir el crecimiento de hongos y bacterias y ablandar suficientemente los tejidos. Se facilita así el aplastamiento y la eliminación posterior del tejido cortical que rodea al tejido transmisor, operación que se realiza con unas agujas enmangadas, con el objeto de evitar confusión en la observación de los tubos polínicos. El material se montó mediante aplastamiento (*squash*), entre portaobjetos y cubreobjetos, con una gota de Azul de anilina al 0,1 % en PO₄K₃ 0,1 N (Linskens y Esser, 1957), para conseguir

Figura 3.1: *Preparación del material.*

- (a) Establecimiento de las poblaciones de flores mediante la señalización de las ramas elegidas con cintas adhesivas de colores.
- (b) Flor en antesis y yema en estado de botón globoso.
- (c) Anteras procedentes de yemas en estado de botón globoso.
- (d) Pincel, malla de 0,26 mm de luz y frascos empleados en la obtención del polen a partir de las anteras dehiscidas.
- (e) Flor emasculada.
- (f) Flores cortadas, emasculadas y colocadas sobre espuma de florista en bandejas con agua.



la tinción de la callosa. La callosa es un polisacárido compuesto por 1-3 β glucanos, que se deposita en la pared del tubo polínico y en forma de tapones a diferentes intervalos durante el crecimiento de los tubos polínicos. La tinción del material con Azul de anilina permite a la callosa fluorescer bajo luz ultravioleta (Currier, 1957), mostrándose de un color amarillo verdoso brillante que resalta del resto de tejidos del pistilo y permite así el seguimiento de los tubos polínicos a través de las estructuras pistilares.

Una vez montadas las preparaciones, se observaron con un microscopio de fluorescencia de luz incidente para luz violeta Ortolux II con filtro D (filtro excitador BP 355-425 y filtro bloqueador LP 460).

3.2.4 Técnicas histológicas

3.2.4.1. Fijación e inclusión del material

Al igual que en el apartado anterior, se recogieron diariamente entre 10 y 15 flores de cada población durante 20 días a partir del día 0. En el campo, las flores y posteriormente los frutos se introdujeron en botes herméticos con papel de filtro húmedo para evitar su desecación en el traslado al laboratorio, donde tras ser limpiadas de los restos del cáliz, escamas y tricomas, se fijaron los ovarios para su posterior inclusión en parafina o resina sintética.

Para la inclusión en parafina, los pistilos se fijaron enteros en FAA y se almacenaron a 4°C. Previamente a la inclusión, se deshidrató en una serie de alcohol butílico terciario (TBA) (70, 85, 95 y 100%) (Tabla 3.1) y finalmente se incluyó en parafina siguiendo una modificación de Jensen (1962) (Tabla 3.2).

Para la inclusión en resina sintética, los pistilos fueron cortados en segmentos de 1-3 mm para favorecer la penetración del fijador y la inclusión, se fijaron en una solución al 2,5% de glutaraldehído en tampón fosfato 0,03 M (Sabatini *et al*, 1963) durante 4 h a temperatura ambiente, se lavaron con tampón fosfato 0,03 M, se deshidrataron en una serie de alcohol etílico (35, 50 y 70 y 95%) y finalmente se incluyeron en resina sintética JB4 (Polysciences Inc., Warrington, Pensilvania, Estados Unidos) (Tabla 3.3)

3.2.4.2. Obtención de cortes

Una vez incluido el material, se realizaron los cortes para su observación al microscopio. Los bloques de parafina se cortaron en un microtomo de rotación 1130/Biocut (Reichert-Jung, Heidelberg, Alemania) a 10 μm y se montaron sobre los portaobjetos con pegamento Haupt (Haupt, 1930) y agua formolada al 3%. Para la obtención del pegamento Haupt, se disolvió 1 g de gelatina pura en 100 cm^3 de agua destilada a 30°C, añadiendo posteriormente 2 g de cristales de fenol y 15 cm^3 de glicerina. La gelatina y la glicerina proporcionan adherencia, mientras que el fenol previene la contaminación de hongos y bacterias, y el agua formolada actúa como fijador, desnaturalizando la gelatina y previniendo la pérdida de adherencia durante tratamientos posteriores. Para su tinción, los cortes fueron desparafinados con tres baños de HistoClear (CellPath, Reino Unido) e hidratados en una mezcla HistoClear:etanol [1:1 (v/v)] y una serie de alcohol etílico (100, 70 y 40%) (Tabla 3.4).

Los bloques de resina sintética se cortaron en un ultramicrotomo Ultracut E (Reichert-Jung, Heidelberg, Alemania) a 2 μm , montándose cada corte obtenido sobre una gota de agua destilada colocada en un portaobjetos recubierto de gelatina al 1%, dejándose secar a 30°C.

3.2.4.3. Tinción de los cortes

Una vez obtenidos los cortes, tanto en parafina como en resina sintética, se procedió a su tinción, bien para su observación con luz fluorescente (Tabla 3.5) o luz normal (Tabla 3.6). Las observaciones de las tinciones fluorescentes se realizaron en un microscopio Ortholux II bajo epiiluminación fluorescente con filtro D (filtro excitador BP 355-425, filtro bloqueador LP 460) para Azul de anilina y Calcoflúor y con filtro I₂ (filtro excitador BP 450-490, filtro bloqueador LP 515) para Auramina y Naranja de acridina. Las observaciones de las tinciones no fluorescentes se realizaron en el mismo microscopio pero con luz normal transmitida.

Tabla 3.1: Composición en % (v/v) de la serie de alcohol butílico terciario (*TBA*) empleada para la deshidratación del material previa a su inclusión en parafina

	H ₂ O	ALCOHOL METILICO	ALCOHOL ETILICO	<i>TBA</i> puro
<i>TBA</i> 50%	50	40	-	10
<i>TBA</i> 70%	30	50	-	20
<i>TBA</i> 85%	15	50	-	35
<i>TBA</i> 95%	-	45	-	55
<i>TBA</i> 100%	-	-	25	75

Tabla 3.2: Proceso de deshidratación de material fijado en FAA para su posterior inclusión en parafina.

DIA	SOLUCION	TIEMPO (h)	TEMPERATURA
1-3	Alcohol etílico 70%	72	ambiente
4	<i>TBA</i> 70%	24	ambiente
5	<i>TBA</i> 85%	1	ambiente
	<i>TBA</i> 95%	1½	ambiente
	<i>TBA</i> 100%	1½	ambiente
	<i>TBA</i> puro I	1½	ambiente
	<i>TBA</i> puro II	1	ambiente
	<i>TBA</i> puro III	17½	30°C
6	<i>TBA</i> + aceite parafinado	24	30°C
7	Material de la mezcla anterior sobre parafina	24	60°C
8-10	Parafina I	6	60°C
	Parafina II	66	60°C
11	Parafina III	≥168	60°C
12	Inclusión		

Tabla 3.3: Proceso de deshidratación de material fijado en glutaraldehído para su posterior inclusión en resina sintética JB4

DIA	SOLUCION	TIEMPO (h)	TEMPERATURA
1	Tampón fosfato 0,03 M	1	4°C
	Tampón fosfato 0,03 M	1	4°C
2	Tampón fosfato 0,03 M	1	ambiente
	Alcohol etílico 35%	1	ambiente
	Alcohol etílico 50%	1	ambiente
	Alcohol etílico 70%	1	ambiente
	Alcohol etílico 95%	1	ambiente
	Solución A catalizada (100 ml solución A + 0,9 g catalizador)	≥19	4°C
3	25 ml de solución A catalizada + 1 ml de solución B	1	ambiente
	Inclusión		baño de hielo

Tabla 3.4: Proceso de hidratación de cortes de parafina a temperatura ambiente.

SOLUCION	TIEMPO (min)
Histoclear I	5
Histoclear II	5
Histoclear III	5
Histoclear:etanol	5
Alcohol etílico 100%	2
Alcohol etílico 50%	2
Alcohol etílico 70%	2
Alcohol etílico 40%	2
Agua destilada	2



Tabla 3.5: Composición, uso y aplicación empleada de distintas tinciones histoquímicas fluorescentes.

TINCION	SUSTRATO TEÑIDO (COLOR)	APLICACION	TIEMPO DE TINCION	COMPOSICION	REFERENCIA
Azul de anilina	Callosa (amarillo verdoso)	Tubos polímeros Viabilidad de óvulos	15 min	Azul de anilina 0,1 % (v/v) en PO_4K_3 0,1 N	(Currier, 1957; Linskens y Esser, 1957)
Auramina O	Cutina y suberina (amarillo)	Cutícula	15 min	Auramina O 0,01% (m/v) en tampon fosfato 0,05 M	(Heslop-Harrison, 1977)
Calcioflúor	Celulosa (azul brillante)	Paredes celulares	Inmediato	Calcioflúor 0,07% (m/v) en agua destilada	(Hughes y McCully, 1975)
Naranja de acridina	ADN y ARN (verde y naranja)	Actividad celular	1 mm/Lavado con agua destilada	Naranja acridina 0,01% (m/v) en tampon fosfato 0,03 M	(Nicholas <i>et al.</i> , 1986; Dudley <i>et al.</i> , 1987)

Tabla 3.6: Composición, uso y aplicación empleada de distintas tinciones histoquímicas para luz normal.

TINCION	SUSTRATO TEÑIDO (COLOR)	APLICACION	TIEMPO DE TINCION	COMPOSICION	REFERENCIA
Azul de toluídina	No específico (metacromasia)	Estructura general	1 mm/Lavado con agua destilada	Azul de toluídina al 0,05% (m/v) en tampon acetato pH=4.4	(Feder y O'Brien, 1968)
I_2KI	Almidón (pardo)	Reservas	5 min	2 g de IK y 0,2 g de I_2 en 100 ml de H_2O	(Johansen, 1940)
PAS	Carbohidratos insolubles (rojo y rosa)	Reservas y estructura	90 min ácido periódico 1% 3 lavados 10 min con agua destilada 60 min Schiff en oscuridad 3 lavados 10 min con agua destilada	Reactivo de Schiff	(Feder y O'Brien, 1968)
PAS + Azul de toluídina	No específico (metacromasia)	Estructura general y reservas	Tinción PAS Secado a 60°C Tinción Azul de toluídina	Reactivo de Schiff Azul de toluídina al 0,05% (m/v) en tampon acetato pH=4.4	(Feder y O'Brien, 1968)

3.3 RESULTADOS

Desde la polinización hasta el momento de la fecundación, los tubos polínicos atraviesan una serie de diferentes estructuras a lo largo del pistilo (Fig. 3.2). El estigma de albaricoquero es de tipo húmedo y está formado por papilas (Fig. 3.3a), que producen hacia el exterior una secreción en el momento de la anthesis (Fig. 3.3b). El estilo es compacto (Fig. 3.3c), presentando en el centro de su sección el tejido transmisor, que se encuentra rodeado de haces vasculares y tejido parenquimático (Fig. 3.3d). En la parte superior del ovario se encuentran dos obturadores, situados encima de cada uno de los dos óvulos (Fig. 3.3e). En el interior del óvulo, el saco embrionario se encuentra rodeado de la nucela, que a su vez está recubierta por los tegumentos (Fig. 3.3f).

Los granos de polen llegan al estigma y entran en contacto con la secreción. El grano de polen sin hidratar tiene forma elíptica. Cuando comienza a hidratarse se ponen de manifiesto los *colpus* (Fig. 3.4a). A continuación, el grano de polen se hidrata (Fig. 3.4b) y germina (Fig. 3.4c), dando lugar al tubo polínico, que se dirige hacia el estilo (Fig. 3.4d). A medida que los tubos polínicos avanzan a través del tejido transmisor, dejan atrás restos no funcionales, que son aislados del extremo mediante tapones de callosa (Fig. 3.4e y 3.4f).

Los tubos polínicos comienzan a llegar a la base del estilo entre el tercer y cuarto día después de la polinización, tanto en 'Moniquí' como en 'Búlida' (Fig. 3.5a). Cuatro días después de la polinización todos los pistilos presentan tubos polínicos en la base del estilo en los dos cultivares (Fig. 3.5b). Sin embargo, el número de tubos polínicos que llegan a la base del estilo se va incrementando hasta el día 7, a partir del cual el número de tubos en la base del estilo se estabiliza. A pesar de utilizar el mismo polen de 'Canino', el número final de tubos polínicos que alcanza la base del estilo es mayor en 'Búlida' que en 'Moniquí' (Fig. 3.5c).

En 'Moniquí', una vez en el ovario, los tubos polínicos alcanzan la parte superior del obturador 5 días después de la polinización (Fig. 3.6a), sobrepasándolo un día después (Fig. 3.6b), e introduciéndose, a través del micropilo (Fig. 3.6c), en la nucela (Fig. 3.6d). A partir del sexto día tiene lugar la fecundación (Fig. 3.6e y 3.6f).

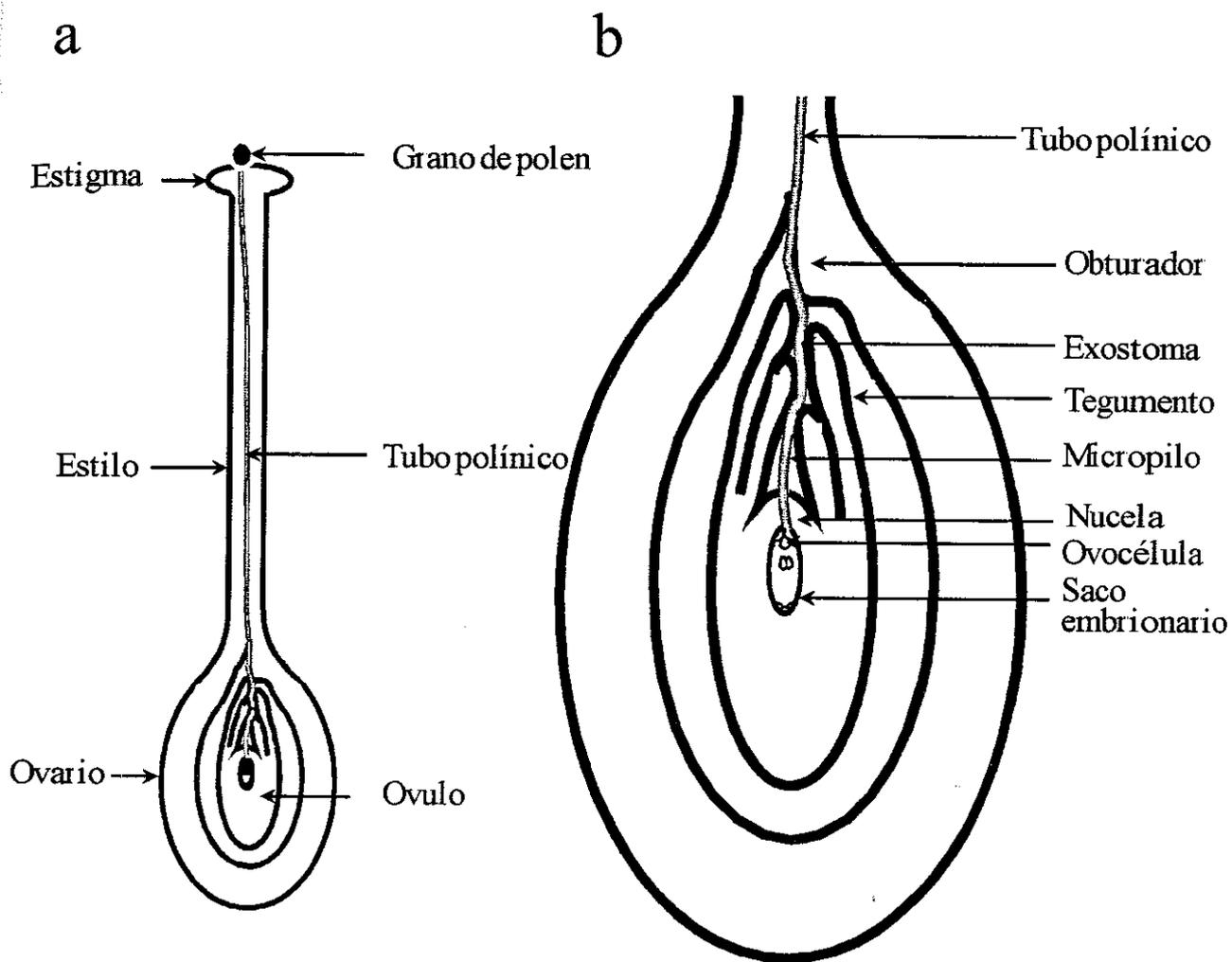


Figura 3.2: Esquema del pistilo (a) y del ovario (b) de una flor de albaricoquero mostrando el camino recorrido por el tubo polínico

Figura 3.3: Anatomía de la flor de albaricoquero.

- (a) Sección longitudinal del estigma de una flor en antesis de 'Búlida' TI, tejido transmisor. Las flechas señalan papilas estigmáticas. Tinción: PAS + Azul de toulidina. x 83. Barra = 100 μ m
- (b) Granos de polen en el estigma de una flor de 'Moniquí' 90 min después de la polinización *, grano de polen; S, secreción estigmática. Las flechas señalan papilas estigmáticas. Tinción: Naranja de acridina. x 528. Barra = 20 μ m
- (c) Sección transversal del estilo de una flor de 'Moniquí' 5 días después de antesis. La flecha señala el tejido transmisor. Tinción: Naranja de acridina. x 83. Barra = 100 μ m
- (d) Sección transversal del tejido transmisor de una flor de 'Moniquí' 5 días después de antesis. La flecha señala el tejido transmisor. Tinción: Naranja de acridina. x 211. Barra = 50 μ m.
- (e) Sección longitudinal del ovario de una flor de 'Moniquí' en antesis. OB, obturador; OV, óvulo. Tinción: Calcofluor. x 83. Barra = 100 μ m
- (f) Sección longitudinal del óvulo de una flor de 'Moniquí' en antesis. SE, saco embrionario; NU, nucela; TE, tegumento. Tinción: PAS. x 528. Barra = 20 μ m

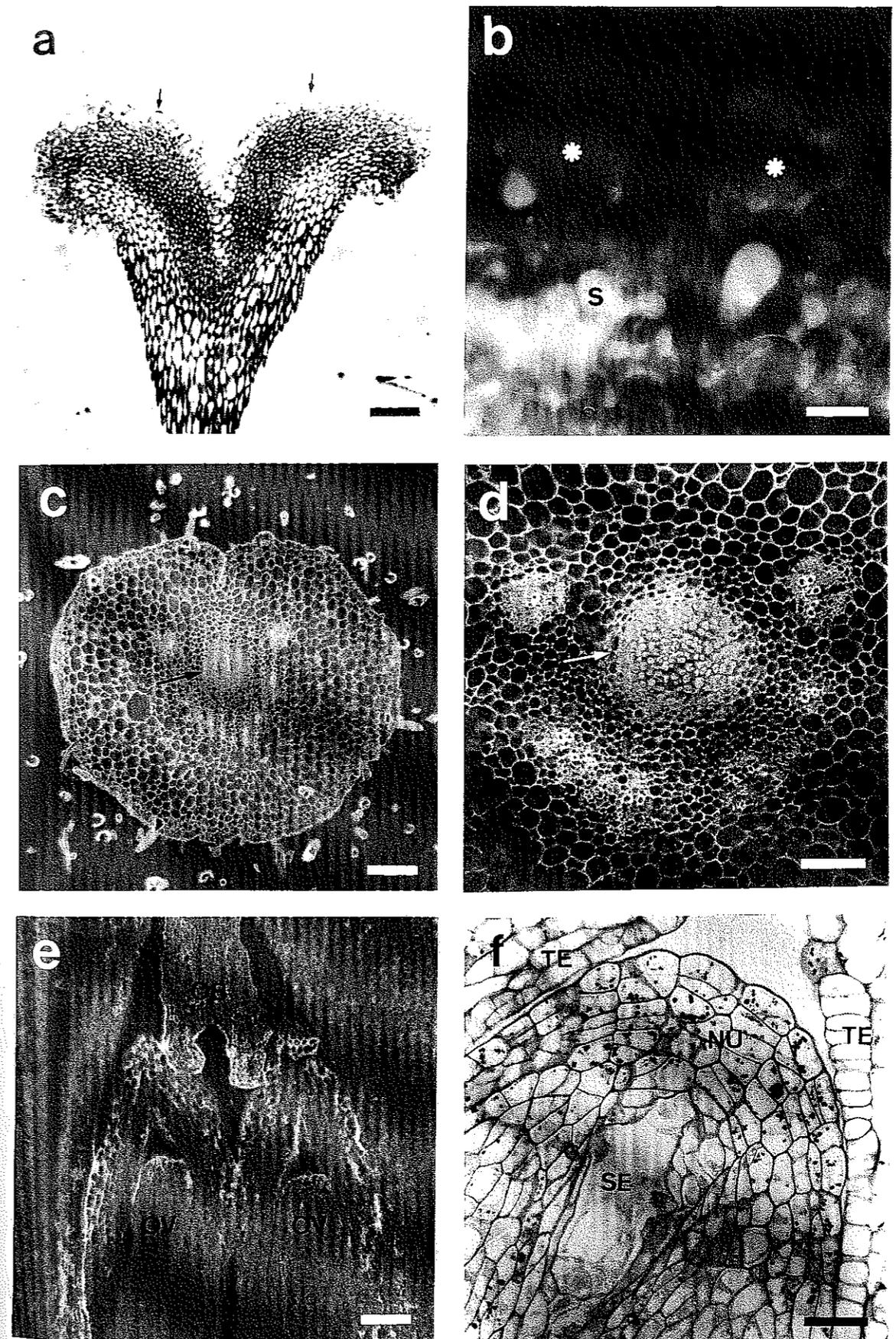
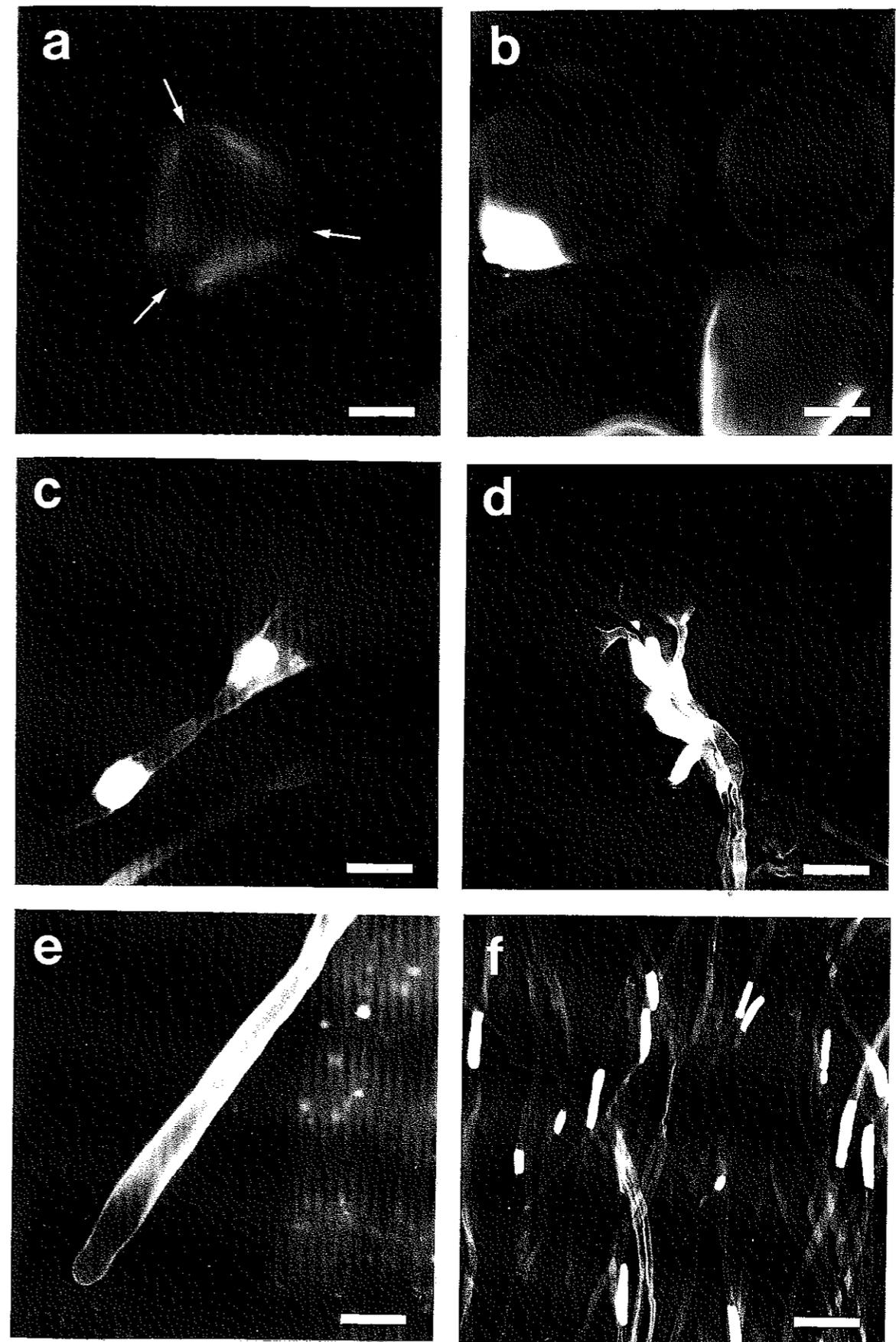


Figura 3.4: Germinación y crecimiento de los tubos polínicos en el estilo en albaricoquero

- (a) Grano de polen comenzando a hidratarse. Las flechas señalan los *colpus*. Tinción: Auramina x 560. Barra = 20 μm .
- (b) Granos de polen hidratados. Tinción: Azul de anilina x 560. Barra = 20 μm .
- (c) Grano de polen germinado, con el tubo polínico emergiendo a través de uno de los *colpus*. Tinción: Azul de anilina x 560. Barra = 20 μm .
- (d) Granos de polen en el estigma, con los tubos polínicos avanzando hacia el tejido transmisor. Tinción: Azul de anilina x 224. Barra = 50 μm .
- (e) Extremo de un tubo polínico avanzando por el tejido transmisor. Tinción: Azul de anilina x 560. Barra = 20 μm .
- (f) Tubos polínicos en el tejido transmisor en la parte central del estilo, mostrando tapones de callosa. Tinción: Azul de anilina x 224. Barra = 50 μm .



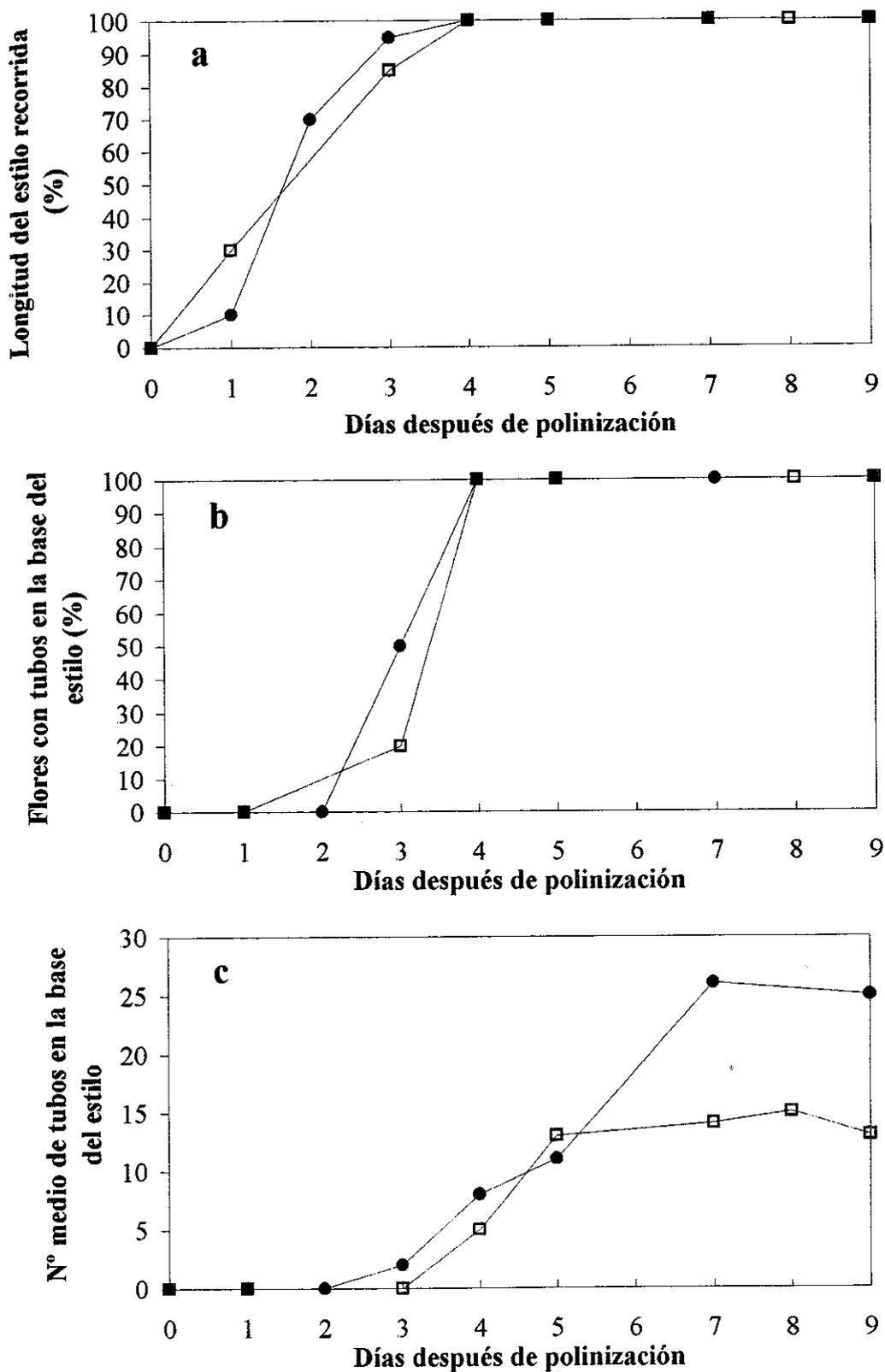
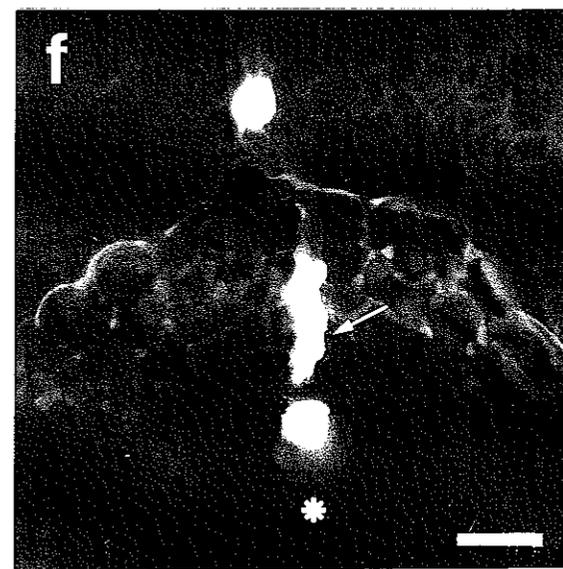
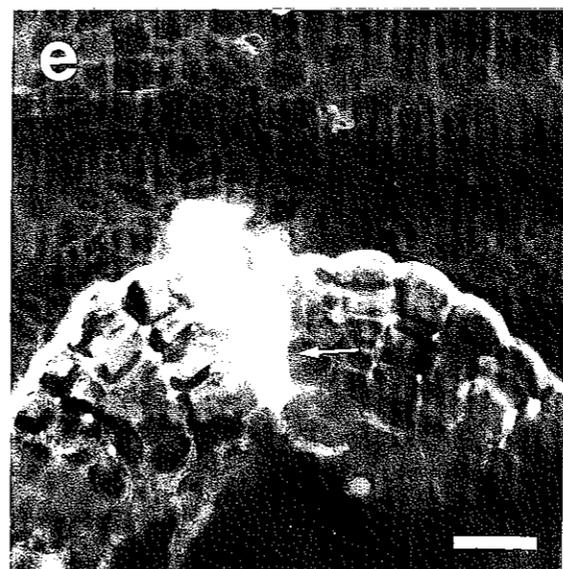
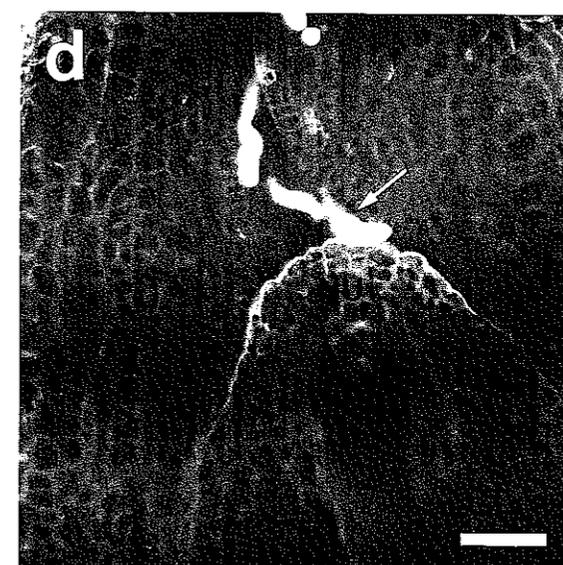
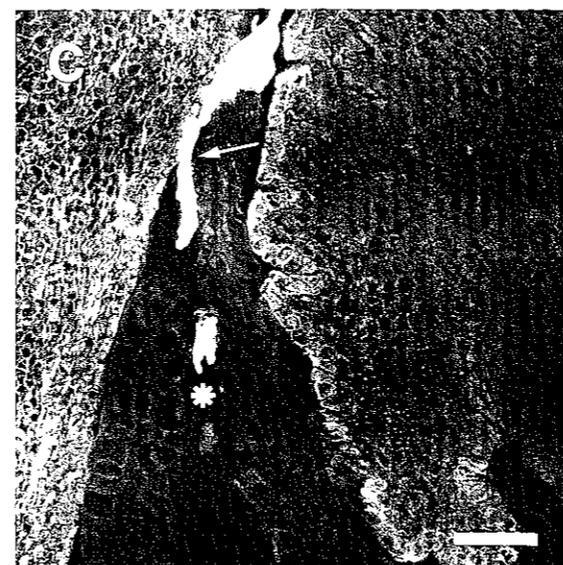
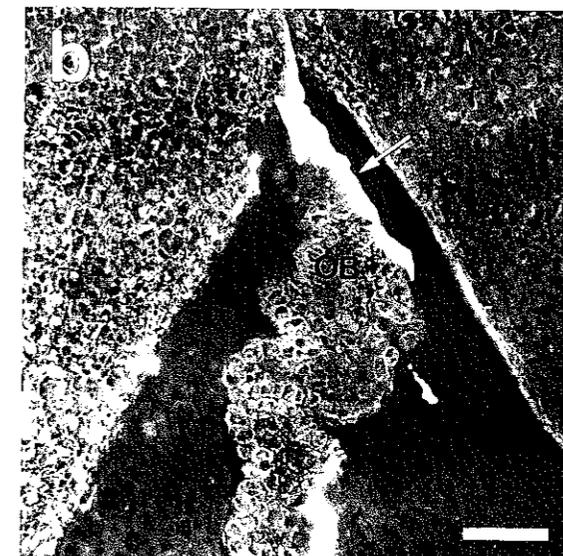
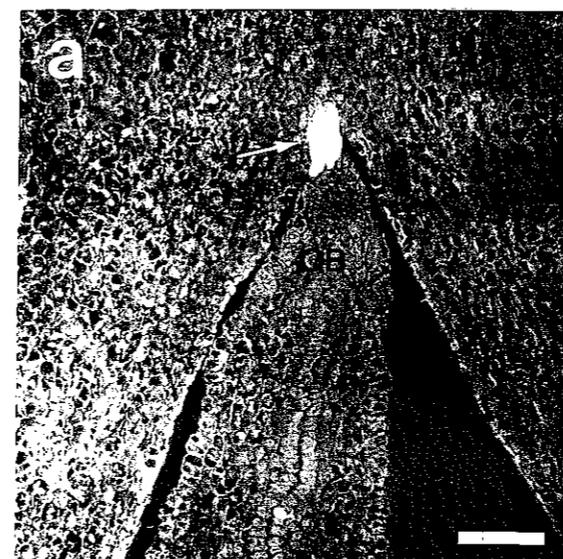


Figura 3.5: *Crecimiento de los tubos polínicos en el estilo de 'Moniquí' y 'Búlida'.* Porcentaje de la longitud del estilo recorrida por los tubos polínicos (a), porcentaje de flores con tubos polínicos en la base del estilo (b) y número medio de tubos polínicos que han alcanzado la base del estilo (c), en condiciones de campo desde la polinización hasta 9 días después, en los cultivares 'Moniquí' (□) y 'Búlida' (●) polinizadas con polen de 'Canino' en 1993

Figura 3.6: Crecimiento de los tubos polínicos en el ovario de flores de 'Moniquí'. Las flechas señalan tubos polínicos.

- (a) Tubos polínicos en la parte superior del obturador 5 días después de la polinización. OB, obturador. Tinción: Azul de anilina x 218. Barra = 50 μ m.
- (b) Tubo polínico sobrepasando el obturador 5 días después de la polinización. OB, obturador. Tinción: Azul de anilina x 218. Barra = 50 μ m.
- (c) Tubo polínico entrando en el micropilo 5 días después de la polinización. *, micropilo. Tinción: Azul de anilina x 218. Barra = 50 μ m.
- (d) Tubo polínico llegando a la nucela a través del micropilo. Día 10 después de la polinización. NU, nucela. Tinción: Azul de anilina x 218. Barra = 50 μ m.
- (e) Tubo polínico entrando en la nucela. Día 9 después de la polinización. Tinción: Azul de anilina x 544. Barra = 20 μ m.
- (f) Tubo polínico entrando en el saco embrionario. Día 10 después de la polinización. *, saco embrionario. Tinción: Azul de anilina x 544. Barra = 20 μ m.



3.4 DISCUSION

En albaricoquero, la fase comprendida entre la polinización y la fecundación se desarrolla de forma similar a otras especies próximas. La secuencia de acontecimientos es semejante a la que tiene lugar en melocotonero (Herrero y Arbeloa, 1989). Sin embargo, la cinética de los tubos polínicos en su camino hacia el saco embrionario se desarrolla durante un período de tiempo considerablemente más corto: mientras que en melocotonero los tubos polínicos emplean 7 días en llegar a la base del estilo, en albaricoquero llegan en sólo 3-4 días. Del mismo modo, la fecundación en albaricoquero tiene lugar 13 días antes que en melocotonero (día 6 frente a día 19 después de la polinización). Por lo tanto, las estructuras y los procesos parecen conservarse entre especies, aunque la escala de tiempo parece ser diferente. Estas diferencias en el desarrollo de los mismos procesos pueden ser debidas a factores externos o internos. Es conocido que el crecimiento de los tubos polínicos se ve afectado por la temperatura (Williams, 1970a). Sin embargo, las diferencias encontradas entre albaricoquero y melocotonero, al desarrollarse la floración en la misma época, dentro de unas condiciones ambientales similares, parecen demasiado pronunciadas como para deberse únicamente a la temperatura. Alternativamente, estas diferencias podrían ser explicadas por causas intrínsecas a la flor. Por otra parte, en algunas especies se ha sugerido que la longitud del estilo podría justificar diferencias en el tiempo empleado por los tubos polínicos en recorrerlo (Mulcahy *et al.*, 1975). Sin embargo, la mayor longitud de los estilos de 'Moniquí' frente a la mayoría de los melocotoneros cultivados debería favorecer un retraso en el crecimiento de los tubos, cuando en realidad ocurre lo contrario. Mientras que la morfología de la flor por sí misma no parece justificar estas diferencias, en melocotonero se ha observado que el estado de desarrollo de la estructuras pistilares tiene un claro efecto sobre la cinética de los tubos polínicos (Herrero y Arbeloa, 1989). Un desarrollo más acelerado del pistilo en albaricoquero podría ocasionar las diferencias encontradas.

La fase de polinización a fecundación es determinante del cuajado en los frutales de hueso, ya que la fecundación de al menos uno de los óvulos es necesaria para la formación del fruto. Aunque el desarrollo de las estructuras de la flor y el proceso reproductivo están altamente conservados entre especies, se ha visto aquí que su duración es muy variable. Esta situación, además de poder verse afectada por



condiciones externas, podría estar determinada por factores intrínsecos a la flor. La gran actividad metabólica necesaria tanto para el desarrollo del pistilo como para el crecimiento de los tubos polínicos requiere una gran cantidad de recursos, que no pueden producirse directamente de la actividad fotosintética al tener lugar estos procesos en ausencia de hojas. El estudio de la procedencia de estos recursos, su distribución, disponibilidad y cantidad, podría aclarar su implicación en el desencadenamiento de los mecanismos que llevan a la fecundación y el cuajado de frutos. Mientras que estos procesos se ven asegurados con una buena polinización, sería necesario evaluar hasta qué punto esto ocurre en condiciones de cultivo y si la polinización puede ser condicionante del cuajado de 'Moniquí' y responsable de los cuajados erráticos observados en este cultivar.

4. LA POLINIZACION COMO CONDICIONANTE DEL
CUAJADO EN ALBARICOQUERO cv MONIQUI

4. LA POLINIZACION COMO CONDICIONANTE DEL CUAJADO EN ALBARICOQUERO cv MONIQUI

4.1 INTRODUCCION

El albaricoquero es un cultivo que sufre con frecuencia producciones erráticas (Mehlenbacher *et al* , 1991). Uno de los factores que pueden provocar esta situación es la marcada zonalidad de la especie, cuyos cultivares suelen adaptarse únicamente a áreas geográficas con unas condiciones ecológicas muy determinadas (Bailey y Hough, 1975), obteniéndose bajos rendimientos cuando se cultivan en otras regiones. Sin embargo, las causas de estas dificultades de adaptabilidad no están bien determinadas. La polinización y las relaciones de compatibilidad polen-pistilo no se han estudiado en profundidad, ya que esta especie es básicamente autocompatible (Bailey y Hough, 1975). Sin embargo, la existencia de cultivares autoincompatibles es conocida desde hace tiempo en Estados Unidos (Schultz, 1948) y, más recientemente, en Europa (Nyujto *et al* , 1985) y Nueva Zelanda (McLaren y Fraser, 1996). Del mismo modo, en Murcia se han conseguido mayores porcentajes de cuajado tras polinizaciones controladas en cruzamientos intervarietales que en autocruzamientos (Egea *et al* 1991; Burgos *et al* 1993), indicando que la autoincompatibilidad puede ser un factor limitante de la producción en varios de los cultivares estudiados (Burgos *et al* 1993). Sin embargo, es difícil determinar hasta qué punto los bajos porcentajes de cuajado obtenidos en situaciones reales de cultivo son provocados por problemas de polinización, ya que muchos otros factores intervienen en la determinación del cuajado.

Los cultivares de albaricoquero cultivados tradicionalmente en Aragón son 'Paviot' y 'Moniquí'. Especialmente esta última presenta graves problemas de cuajado, lo que ha originado una fuerte recesión de su cultivo pese a la demanda existente por sus excelentes características organolépticas. Diferentes condicionantes, como las heladas primaverales y la susceptibilidad a *Monilia* (Escudero y Rodríguez Navarro, 1990) han sido asociados tradicionalmente a los cuajados erráticos. Sin embargo, no siempre ha sido posible establecer relaciones causa-efecto. La autoincompatibilidad mostrada por 'Moniquí Fino', y la interincompatibilidad entre 'Moniquí Fino' y 'Moniquí Borde' en Murcia (Egea *et al* , 1991; Burgos *et al* , 1993), hacen interesante estudiar hasta qué punto los factores relacionados con la

polinización podrían influir en los cuajados erráticos de 'Moniquí' en la zona de Zaragoza, donde tradicionalmente se cultiva junto a 'Paviot'. Con este objetivo, se ha estudiado la cinética de los tubos polínicos, y con ella la compatibilidad o incompatibilidad de los autocruzamientos y cruzamientos obtenidos de la combinación de estos dos cultivares con los dos más cultivados en España: 'Búlida', en Murcia, y 'Canino' en Valencia (MAPA, 1991). Finalmente, con el fin de evaluar la incidencia que puede tener la polinización en los cuajados erráticos registrados en este cultivar, se ha realizado un ensayo de polinización suplementaria en una plantación comercial de 'Moniquí' en la localidad de Garrapinillos, que se encuentra enclavada en la más importante zona de cultivo del cultivar en la provincia de Zaragoza, combinando el estudio en campo del cuajado obtenido tras la polinización suplementaria con observaciones al microscopio del comportamiento de los tubos polínicos en flores tratadas y en flores dejadas a polinización libre.

4.2 MATERIAL Y METODOS

4.2.1 Polinizaciones en laboratorio

El ensayo se realizó durante los años 1993 y 1994, utilizando flores de 'Moniquí', 'Búlida', 'Canino' y 'Paviot', procedentes de la colección de cultivares de la EE Aula Dei en Montañana (Zaragoza) (Apartado 2.2.1). El estudio se completó en 1996 con el clon 'Royal' 2097 sobre 'Mirobolán B', de la misma colección.

Se realizaron los 16 cruzamientos posibles entre las 4 primeros cultivares, incluyendo los 4 autocruzamientos, para establecer las relaciones de auto e intercompatibilidad. Para la obtención de polen de cada uno de los 4 cultivares se siguió el procedimiento descrito anteriormente (Apartado 3.2.2.2).

Por otro lado, se recogieron flores de los cuatro cultivares también en estado D. Se eliminaron manualmente anteras y pétalos dejando únicamente el pistilo y se colocaron sobre espuma de florista a temperatura ambiente (Apartado 3.2.3). A las 24 h con cada uno de los 4 tipos de polen obtenidos se polinizaron 20 flores de cada cultivar, que 72 h más tarde se fijaron en FAA (formaldehído - ácido acético - etanol 70%) (1:1:18) (Johansen, 1940).

4.2.2 Ensayo de polinización suplementaria

El ensayo de polinización suplementaria (Williams, 1970a) se llevó a cabo en 1995 en una plantación comercial de 'Moniquí'. En la plantación se encontraban intercalados en pequeña cantidad algunos árboles de 'Paviot' que no coincidían en el período de floración con 'Moniquí' en el momento de realizarse el ensayo. Se eligieron al azar cuatro árboles, marcando aleatoriamente en cada uno de ellos varias ramas, hasta obtener aproximadamente 1000 flores por árbol, después de eliminar las yemas más atrasadas y las flores más adelantadas. La mitad de las flores se dejaron a polinización libre como control y el resto se polinizaron manualmente con polen de 'Canino', compatible con 'Moniquí' según resultados previos obtenidos en laboratorio. Se efectuaron conteos de flores el día de la sobrepolinización y de frutos 7 semanas después, una vez establecido el cuajado inicial. Por otra parte, se recogieron muestras de las 2 poblaciones de flores en estado de caída de pétalos una semana después de la polinización, cuando los tubos polínicos ya han llegado a la base del estilo (Apartado 3.3), y se fijaron en FAA para su posterior observación al microscopio.

4.2.3 Preparación del material para el microscopio

Con el fin de estudiar la germinación del polen y el crecimiento de los tubos polínicos, los pistilos previamente fijados se prepararon mediante aplastamiento (*squash*) según el procedimiento descrito anteriormente (Apartado 3.2.3) con una gota de Azul de anilina al 0,1 % en PO_4K_3 0,1 N (Linskens y Esser, 1957), permitiendo así el seguimiento de los tubos polínicos a través de las estructuras pistilares.

Una vez montadas las preparaciones, se observaron con un microscopio de fluorescencia de luz incidente para luz violeta Ortolux II con filtro D (filtro excitador BP 355-425 y filtro bloqueador LP 460)

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Polinizaciones en laboratorio

Las observaciones sobre el crecimiento de los tubos polínicos mostraron claras diferencias entre cruzamientos. Mientras que en la mayoría de los cruzamientos los tubos polínicos crecieron hasta la base del estilo (Fig. 4.1a), en el autocruzamiento de 'Moniquí' los tubos polínicos detuvieron su crecimiento a lo largo del estilo (Fig. 4.1b). Considerando un número de granos de polen en el estigma inferior a 15 como cantidad baja, entre 15 y 50 media, y más de 50 alta, en la mayor parte de los pistilos se observó una cantidad de granos de polen media o alta en el estigma (Fig. 4.2 y 4.3). Sin embargo, en los cruzamientos realizados en el primer año en los que intervino 'Pavlot', tanto como cultivar polinizador como polinizado, se observaron con frecuencia pistilos sin granos de polen en la superficie estigmática (Fig. 4.2). En el resto de pistilos, cuyos estigmas sí tenían granos de polen, éstos se encontraban en una cantidad baja. Sin embargo, en estos casos también se encontraron tubos polínicos en la base del estilo.

De los 4 autocruzamientos posibles, el único que no presentó tubos polínicos en la base del estilo en prácticamente ninguna de las flores examinadas fue 'Moniquí': solamente uno de los pistilos examinados presentó un único tubo polínico en el segundo año de ensayo. En cuanto al resto de autocruzamientos, 'Búlida' presentó tubos polínicos en la base del estilo en más de un 90% de las flores, mientras que 'Canino' y 'Pavlot' mostraron porcentajes inferiores (Fig. 4.4). En todos los cruzamientos intervarietales, fue muy alto el porcentaje de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo. Sin embargo, el número de tubos polínicos que alcanzaron esta zona fue muy variable entre los cruzamientos, con un promedio de 4,6 y 4,7 en cada uno de los dos años pero oscilando entre 1,3 y 12,7. Este número fue considerablemente mayor en las combinaciones en las que 'Búlida' actúa como cultivar receptor, con una media de 9 en un año y 5,8 en otro, frente a 3,6 y 4,2 de 'Canino', el siguiente cultivar con mayor número de tubos en la base del estilo. En los cruzamientos en los que 'Búlida' fue el cultivar polinizador también se observaron más tubos en la base del estilo, aunque las diferencias existentes fueron menores (4,9 y 3,4 de 'Búlida' frente a 4,6 y 3,4 de 'Moniquí' y 3,3 y 5,7 de 'Canino') (Fig. 4.5). Es destacable la gran cantidad de tubos polínicos en la base del

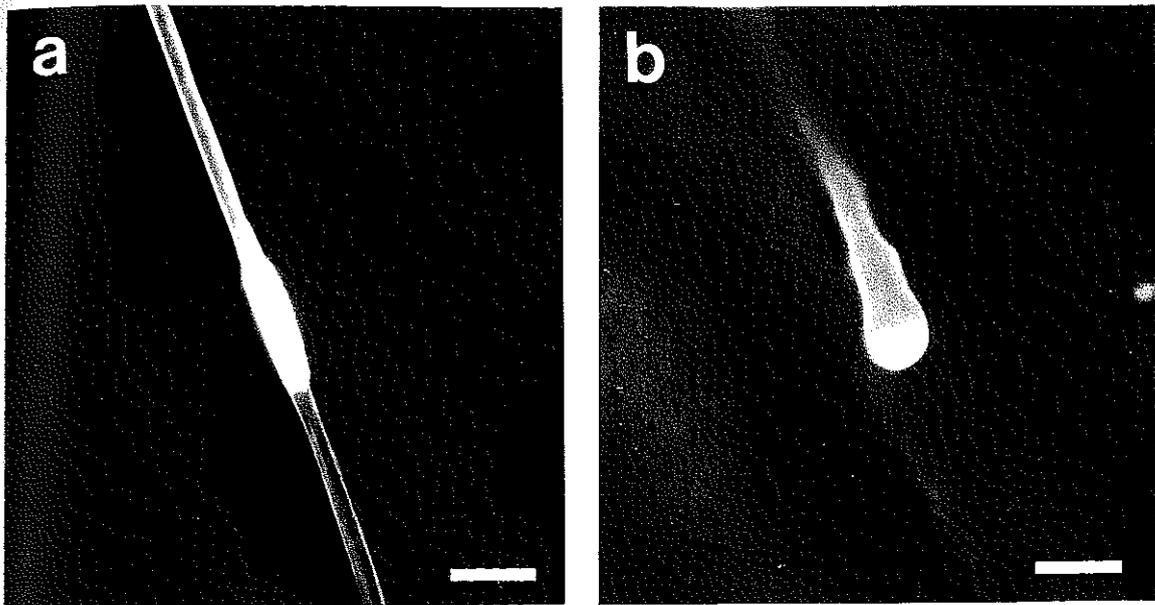


Figura 4.1: Crecimiento de los tubos polínicos en el estilo. a) Crecimiento del tubo en el cruzamiento compatible 'Moniquí' x 'Canino' b) Detención del tubo polínico en el tercio inferior del estilo en el autocruzamiento incompatible de 'Moniquí' La acumulación de callosa en el extremo del tubo muestra la interrupción del crecimiento. x 544 Barra = 20 μm

estilo en el autocruzamiento de 'Búlida', alrededor de 10 en la práctica totalidad de las flores estudiadas. (Fig 4 5)

Por lo tanto, 'Moniquí' se comporta como un cultivar autoincompatible mientras que los otros tres cultivares estudiados lo hacen como autocompatibles. Todos los cruzamientos intervarietales examinados son compatibles (Fig 4 6)

Con el fin de evaluar otro posible polinizador de los cultivares estudiados, en 1996 se examinaron los posibles cruzamientos de los cultivares anteriores con 'Royal', comportándose todos ellos como compatibles (Fig 4 7).

4.3 2. Ensayo de polinización suplementaria

En el ensayo de polinización suplementaria se observaron claras diferencias entre el cuajado final de las flores dejadas a polinización libre y las polinizadas manualmente. El porcentaje de cuajado obtenido en las ramas sobrepolinizadas (30%) fue muy superior al que presentaron las ramas dejadas al azar (6%), representativo del cuajado normal de 'Moniquí' en la zona (Fig 4 8a). Estos resultados indican con claridad que la polinización es un factor determinante del cuajado.

Con el fin de determinar si la falta de cuajado era debida a la falta de polinización o a la presencia de polen incompatible, se observaron al microscopio flores muestreadas al azar. Como era previsible, el 100% de las flores sobrepolinizadas presentaron polen en el estigma, pero en las dejadas a polinización libre, el 90% de las flores también presentaron granos de polen germinados en el estigma.

Sin embargo, al estudiar el comportamiento de los tubos polínicos en las dos situaciones se encontraron claras diferencias: en la mayoría de las flores dejadas a polinización libre, los tubos polínicos detuvieron su crecimiento antes de llegar a la base del estilo, lográndolo sólo en el 15% de los casos, mientras que en las flores polinizadas con 'Canino' los tubos crecieron normalmente, llegando a la base del estilo en el 91% de los casos estudiados (Fig 4 8b). Igualmente, estas diferencias aparecieron en el número de tubos polínicos en la base del estilo entre unas y otras flores. En las sobrepolinizadas el promedio fue de 9, mientras que en las no sobrepolinizadas fue sólo de uno (Fig 4 8c).

		1993			
		1994			
♀ \ ♂		Moniquí	Búlida	Paviot	Canino
Moniquí		11	0	65	5
	Moniquí	0	0	14	0
Búlida		6	0	10	0
	Búlida	0	0	6	0
Paviot		85	22	79	50
	Paviot	0	0	19	0
Canino		0	0	38	0
	Canino	0	0	0	0

Figura 4.2: Porcentaje de pistilos sin granos de polen

		1993			
		1994			
♀ \ ♂		Moniquí	Búlida	Paviot	Canino
Moniquí		++	+++	+	++
	Moniquí	++	+++	+++	+++
Búlida		++	+++	++	+
	Búlida	++	+++	++	++
Paviot		+	+	+	+
	Paviot	+	+	+	+
Canino		++	+++	+	+++
	Canino	++	+++	++	+++

Figura 4.3: Presencia de granos de polen en el estigma
 + : <15
 ++ : 15-50
 +++ : >50

		1993			
		1994			
♀ \ ♂		Moniquí	Búlida	Paviot	Canino
Moniquí		0	85	60	72
	Moniquí	8	78	83	100
Búlida		93	100	94	100
	Búlida	50	82	94	81
Paviot		100	84	35	69
	Paviot	87	100	64	87
Canino		55	80	36	45
	Canino	94	89	75	81

Figura 4.4: Porcentaje de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo a las 72 h de la polinización

		1993			
		1994			
♀ \ ♂		Moniquí	Búlida	Paviot	Canino
Moniquí		0	2,4	1,3	2,4
	Moniquí	1	4	2,8	3,2
Búlida		12,7	10,7	7,6	5,6
	Búlida	5,1	9,4	3,5	5,3
Paviot		3,2	3	2,4	3,3
	Paviot	2,1	8,4	2,4	2,7
Canino		2,4	6,4	3,6	1,9
	Canino	5,3	4,3	3,5	3,7

Figura 4.5: Número medio de tubos polínicos en la base del estilo a las 72 h de la polinización

♀ \ ♂	Moniquí	Búlida	Paviot	Canino
Moniquí	-	+	+	+
Búlida	+	+	+	+
Paviot	+	+	+	+
Canino	+	+	+	+

Figura 4.6: Cruzamientos compatibles (+) e incompatibles (-) entre 4 variedades de albaricoquero

1996	Royal ^a		Royal ^b	
	♀	♂	♀	♂
Moniquí	100	60	4	2
Búlida	88	83	4	3
Paviot	92	92	2	2
Canino	94	13	3	2

Figura 4.7: Porcentaje de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo (a) y número de tubos polínicos en la base del estilo a las 72 h de la polinización (b) en 'Royal'

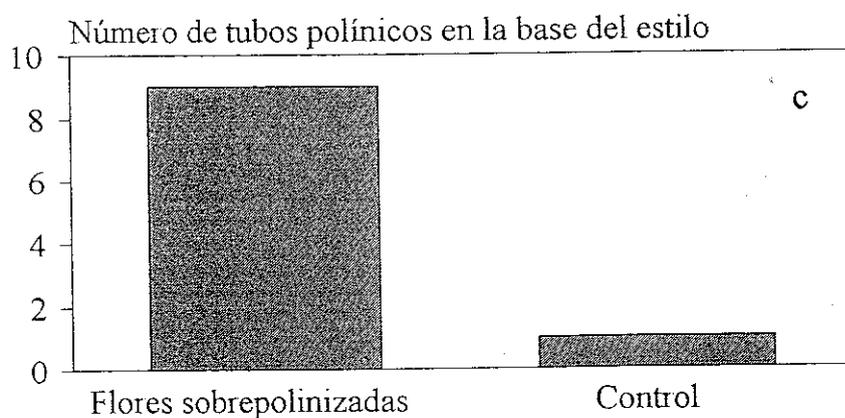
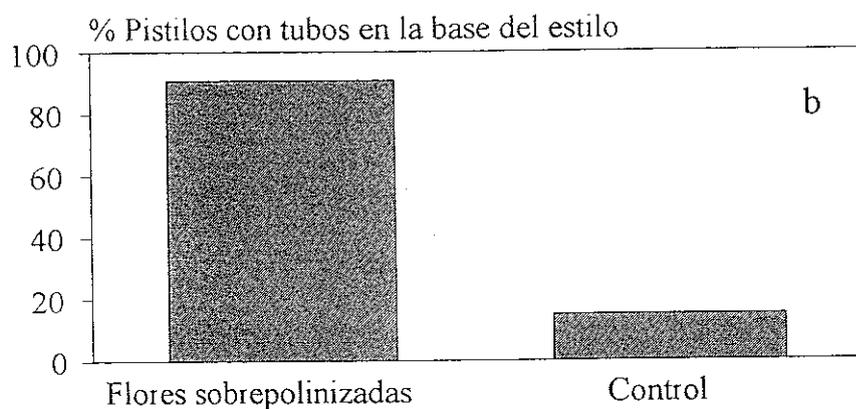
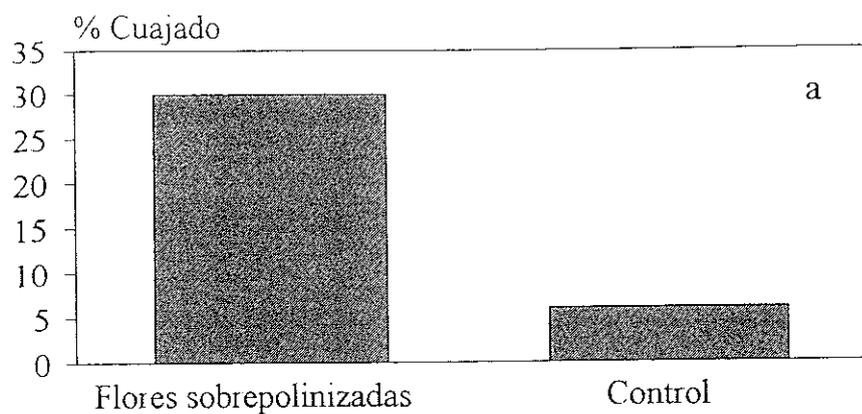


Figura 4.8: *Cuajado y tubos polínicos en la base del estilo*
 Porcentaje de cuajado (a), pistilos con tubos polínicos en la base del estilo (b) y número de tubos polínicos en la base del estilo (c) en flores sobrepolinizadas y flores dejadas a polinización libre de 'Moniquí'. Las tres variables siguen el mismo patrón.

4.4 DISCUSION

4.4.1 Compatibilidad polen-pistilo

Las observaciones al microscopio sobre el crecimiento de los tubos polínicos en los cruzamientos examinados han puesto de manifiesto que únicamente 'Moniquí' se comporta como un cultivar autoincompatible. Estos resultados concuerdan con los ensayos en campo realizados en la EE Aula Dei en la década de los 60 (Cambra, comunicación personal), en los que se obtuvieron muy bajos porcentajes de cuajado en ramas embolsadas de 'Moniquí', frente a porcentajes normales en los cruzamientos con 'Canino', 'Búlida' y 'Paviot' y también con los trabajos obtenidos en Murcia con 'Búlida' (García *et al.*, 1988)

La existencia de gran cantidad de pistilos donde el polen no llegó a germinar en los cruzamientos en los que 'Paviot' actuó como variedad receptor en el primer año, parecen indicar la poca o nula receptividad de los estigmas. Esto no parece ser debido a características varietales, ya que el fenómeno no se observa al año siguiente en los mismos cruzamientos. Análogamente, se observa la misma circunstancia en los cruzamientos en los que 'Paviot' actuó como cultivar polinizador en el mismo año, y cuando nos encontramos con pistilos en los que hay polen germinado, es en muy poca cantidad. Estos hechos podrían ser debidos a problemas de androesterilidad, de forma similar a los casos descritos en cultivares de albaricoquero murcianos (García *et al.*, 1988). Sin embargo, los resultados obtenidos al año siguiente, en los que los granos de polen germinaron con toda normalidad en los mismos cruzamientos, desechan esta hipótesis, pudiendo deberse esta situación a una mala calidad de polen en ese año, siendo incapaz de germinar sobre estigmas receptivos. Una baja calidad del polen se ha asociado a situaciones de estrés en la planta productora del mismo durante el desarrollo de éste (Young y Stanton, 1990)

Todas las combinaciones entre distintos cultivares presentaron tubos polínicos en la parte inferior del estilo, pudiéndose considerar todos los cruzamientos intervarietales compatibles. Destacan aquellos en los que participó 'Bulida', tanto como cultivar polinizador como polinizado, en los que el número de tubos polínicos que llegaron al final del estilo fue mayor que en el resto de las combinaciones. Cuando se comparan los cultivares como donantes de polen, la diferencia en el número de tubos polínicos que llegan al ovario parece indicar un distinto

comportamiento entre los tubos polínicos de los distintos cultivares. Esto coincide con lo observado en *Hibiscus* por Snow y Spira (1991) sobre diferencias de calidad entre tubos polínicos procedentes de distintos genotipos, ya que encontraron unos más rápidos en llegar a la base del estilo que otros, teniendo más posibilidades de éxito en fecundar a los óvulos que el resto. También se han encontrado diferencias en el número de semillas en función del cultivar polinizador en *Actinidia* (González *et al*, 1994).

Cuando 'Bulida' actuó como cultivar polinizado, las diferencias observadas con el resto de cultivares en la cantidad de tubos que llegaron a la base del estilo fueron todavía mayores que cuando lo hizo como cultivar polinizador, lo que podría guardar relación con el papel regulador que el pistilo juega tanto en la cinética de los tubos polínicos (Herrero y Arbeloa, 1989) como en el número de gametofitos masculinos presentes a lo largo del pistilo (Herrero, 1992a). En este contexto, parece probable que las flores de 'Bulida' faciliten el acceso de más tubos polínicos que las de los otros cultivares. El hecho de que existan diferencias entre cultivares en el comportamiento, tanto cuando actúan como donantes de polen como cuando lo hacen como receptores, permite considerar la existencia de diferencias en las distintas combinaciones pistilo-gametofito masculino, de forma que unos emparejamientos tendrían mayores posibilidades de éxito en la fecundación que otros (Hormaza y Herrero, 1994). Como principal muestra de estas buenas combinaciones, destaca el autocruzamiento de 'Bulida', con unos 10 tubos de media en el final del estilo.

4.4.2 Efecto de la polinización en el cuajado de frutos

La correspondencia entre el comportamiento de los tubos polínicos y el cuajado de frutos en 'Moniquí' indica que la polinización ha podido ser la principal causa de las bajas y erráticas producciones en las plantaciones monovarietales en Aragón y haber provocado el descenso de su cultivo pese a la demanda existente por su excelente calidad del fruto para consumo en fresco. La introducción de cultivares adecuados como polinizadores en las plantaciones de 'Moniquí' podría contribuir a mejorar los porcentajes de cuajado, y con ello las producciones. Dependiendo de la adaptación al medio, cualquiera de los otros 4 cultivares estudiados se podría utilizar como polinizador de 'Moniquí', ya que las épocas de floración son coincidentes, con

ligero retraso en 'Búlida' (Herrero y Tabuenca, 1966; Apartado 2 3), los cruzamientos son compatibles, y se podría aprovechar la producción de los 2 cultivares, debiéndose intercalar ambos en las nuevas plantaciones y añadiendo el nuevo cultivar polinizador en las más antiguas, mediante injertos o sustitución de árboles. Una posible opción sería 'Paviot', cultivar del que había algunos árboles en la plantación en la que se realizó el ensayo y que es también tradicional en la zona. Sin embargo, se pueden presentar problemas de producción en años con inviernos no demasiado fríos, como el del año en que se realizó el ensayo, pues, mientras que 'Moniquí' requiere entre 779 h y 926 h con una temperatura inferior a 7° C, 'Paviot' es un cultivar más exigente, necesitando entre 995 y 1075 h, pudiéndose retrasar la floración o incluso no producirse, con lo que no coincidiría con la de 'Moniquí'. Como posibles alternativas, 'Canino', con unas necesidades que oscilan entre 711 y 779 h frío, 'Royal', con 779 y 950 h frío y 'Búlida', entre 950 y 983 h frío (Tabuenca, 1967), presentan unas necesidades de frío invernal similares a 'Moniquí'.

Los problemas de falta de cuajado aquí encontrados debidos a autocompatibilidad y diferencias de requerimientos de frío podrían ser comunes a otras zonas productoras de albaricoques y a otros cultivares, ya que el número de cultivares autoincompatibles descritos aumenta constantemente (Egea *et al.* 1991; Burgos *et al.* 1993; McLaren y Fraser, 1996). El uso de polinizadores adecuados podría contribuir a la solución de la problemática de cuajados erráticos que presenta la especie. De igual forma, ensayos de sobrepolinización como el aquí descrito pueden ser de utilidad en otras situaciones y especies, ya que permiten identificar con claridad si la polinización es la causa fundamental de la falta de cuajado.

5. FRUCTIFICACION: CAIDA Y CRECIMIENTO DE FRUTOS

5. FRUCTIFICACION: CAIDA Y CRECIMIENTO DE FRUTOS

5.1 INTRODUCCION

Desde la antesis hasta la maduración del fruto, se producen una serie de caídas prematuras de flores y frutos. Tanto en frutales de pepita como de hueso, al igual que en otras especies, los principales picos de caída se producen inmediatamente antes de fases intensas de desarrollo (Stephenson, 1981). Harrold (1935) describió tres caídas importantes en melocotonero: la primera dentro de las dos semanas siguientes a antesis, de flores no fecundadas; la segunda, tras el cuajado inicial, cayéndose pequeños frutos ya fecundados, y finalmente, la tercera, inmediatamente antes de la maduración, de frutos de tamaño definitivo pero inmaduros. El mismo patrón de caída se ha observado en otros *Prunus*, como almendro (Kester y Griggs, 1959) y cerezo (Bradbury, 1929, citado en Kester y Griggs, 1959).

En la mayor parte de los frutales de hueso, el crecimiento del ovario desde antesis hasta la maduración del fruto sigue una curva doble sigmoideal (Coombe, 1976). Connors en 1920 (citado en Jackson y Coombe, 1966) distinguió tres fases en el crecimiento del fruto en melocotonero. En la fase I tiene lugar un rápido crecimiento del pericarpio y la nucela. En la fase II, el crecimiento se ralentiza mientras el endocarpio se lignifica, quedando el crecimiento restringido al embrión y al endospermo, alcanzando el embrión su tamaño definitivo. Finalmente, en la fase III el mesocarpio se expande rápidamente hasta el tamaño final. Sin embargo, cada especie presenta distintas características dentro del patrón general. Mientras que en albaricoquero tiene lugar el mismo patrón de crecimiento que en melocotonero pero empleando 30-40 días en la fase I, 40 días en la II y 20 días en la III (Jackson y Coombe, 1966), en almendro la inflexión de la curva correspondiente a la fase III no existe (Brooks, 1939).

En los días posteriores a la antesis se desarrollan en el interior de la flor los procesos que determinarán la transformación en fruto, pues no sólo tiene lugar la fase progámica, que desemboca en la formación del embrión y en el cuajado del fruto, sino que también se establece el número final de células que condicionará su tamaño final. Con el fin de estudiar el proceso de fructificación y caída de frutos en albaricoquero y poder relacionar los resultados obtenidos al microscopio con el

comportamiento de los árboles en campo, se ha seguido, por una parte, el inicio de la fructificación, y por otra, se ha caracterizado la caída de flores y frutos desde la polinización hasta la recolección. Tanto el crecimiento como la caída se han estudiado en dos cultivares: uno, 'Búlida', altamente productivo y otro, 'Moniquí', que teniendo una excelente calidad de fruto, presenta producciones erráticas. Para valorar la incidencia de la polinización, se han estudiado dos poblaciones de flores, unas polinizadas manualmente y otras dejadas sin polinizar. El proceso de caída se ha comparado además con otra población de flores dejadas a polinización libre

5.2. MATERIAL Y METODOS

5.2.1. Material vegetal

Este estudio se realizó en paralelo en dos cultivares de albaricoquero, 'Moniquí' y 'Búlida', durante los años 1993 y 1994. Los ensayos han sido realizados en tres árboles de cada cultivar de la colección de variedades de la EE Aula Dei en Montañana (Zaragoza) (Apartado 2.2.1).

5.2.2. Preparación del material

5.2.2.1. Establecimiento de poblaciones de flores

Durante 1993 y 1994, en los dos cultivares, se siguió el crecimiento y la caída de flores y frutos tanto de flores polinizadas manualmente con polen compatible de 'Canino' (Apartado 4.3.1) como de flores sin polinizar. Para el ensayo de caída se tuvo en cuenta además otra población de flores dejadas a polinización libre. La identificación de las distintas poblaciones se realizó mediante la señalización de las ramas elegidas para cada una con cintas adhesivas de colores (Capítulo 3.2.2.1)

En el seguimiento de la caída se trabajó con una media de 1000 flores/año en ambos cultivares en cada una de las tres poblaciones de flores: polinizadas, sin polinizar y dejadas a polinización libre, mientras que en el establecimiento de las curvas de crecimiento se empleó una media de 600 flores/año.



Para la obtención de polen, emasculación y polinización de las flores, se siguió el procedimiento descrito anteriormente (Apartados 3.2.2.2 y 3.2.2.3). El día posterior a la emasculación de las flores fue considerado día 0 para el control de las poblaciones, día en el que se realizó la polinización manualmente.

5.2.2.2 Conteo de flores y frutos para el control de la caída

Con el fin de caracterizar la caída de frutos, se realizaron conteos semanales, a partir del día 0 en las poblaciones polinizadas y sin polinizar, y a partir de la plena floración hasta la recolección en la población dejada a polinización libre. Los conteos se realizaron dos veces en cada rama, tomando la media de los dos valores como válida cuando la diferencia entre los dos conteos no fuera superior al 10% (Williams, 1970a). Para la determinación del momento en el que se produce el mayor porcentaje de frutos caídos, se calculó también la caída relativa, expresada como el porcentaje de frutos caídos cada semana hasta la madurez respecto al número inicial de flores en antesis.

5.2.2.3 Recogida de flores y frutos para el control del crecimiento

A partir del día 0 se recogieron diariamente entre 10 y 15 flores de cada población durante 20 días. En el campo, las flores se introdujeron en botes herméticos con papel de filtro húmedo en su interior, para evitar su desecación en el traslado al laboratorio, donde, después de eliminar pétalos, sépalos, estambres y escamas, se pesó de forma individual cada pistilo junto a su pedúnculo en una balanza de precisión.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Caída de flores y frutos

En 1993 se obtuvieron curvas de caída y de caída relativa de tres poblaciones: una de flores polinizadas, una de flores sin polinizar y otra de flores dejadas a polinización libre. La comparación de las curvas de caída de flores polinizadas y no polinizadas muestra que, mientras que en las dos poblaciones se produce una caída similar en las dos primeras semanas, ambas se despegan a partir de ese momento, produciéndose una caída más pronunciada en las flores sin polinizar, que finaliza 5 semanas después de antes, cuando han caído todas las flores. La misma situación se produce en los dos años estudiados, tanto en 'Moniquí' (Fig 5.1) como en 'Búlida' (Fig 5.2). La polinización manual provocó un aumento considerable del cuajado en 'Moniquí', pero no en 'Búlida', registrándose diferencias entre los dos años estudiados: mientras que en 1993 los porcentajes de cuajado en flores polinizadas fueron 37% en 'Moniquí' y 26% en 'Búlida', en 1994 las diferencias fueron aún mayores: 60% en 'Moniquí' y 35% en 'Búlida'. En las flores de polinización libre, no se encontraron diferencias entre cultivares, aunque sí entre años (20% en ambos cultivares en 1993 y 30% en 'Moniquí' y 33% en 'Búlida' en 1994) (Fig 5.1 y 5.2).

Los mayores picos de caída en los dos cultivares en 1993 se produjeron dentro de las dos primeras semanas en flores polinizadas, mientras que en flores no polinizadas se originaron posteriormente (Fig 5.3a y 5.4a). Los dos cultivares también presentaron un patrón similar entre ellos en el año siguiente, aunque en este caso los mayores picos de caída se produjeron en la cuarta semana en todas las poblaciones (Fig 5.3b y 5.4b).

Al finalizar la caída masiva de frutos en la cuarta semana, se produce un rápido incremento en la velocidad de crecimiento del fruto (Fig 5.5).

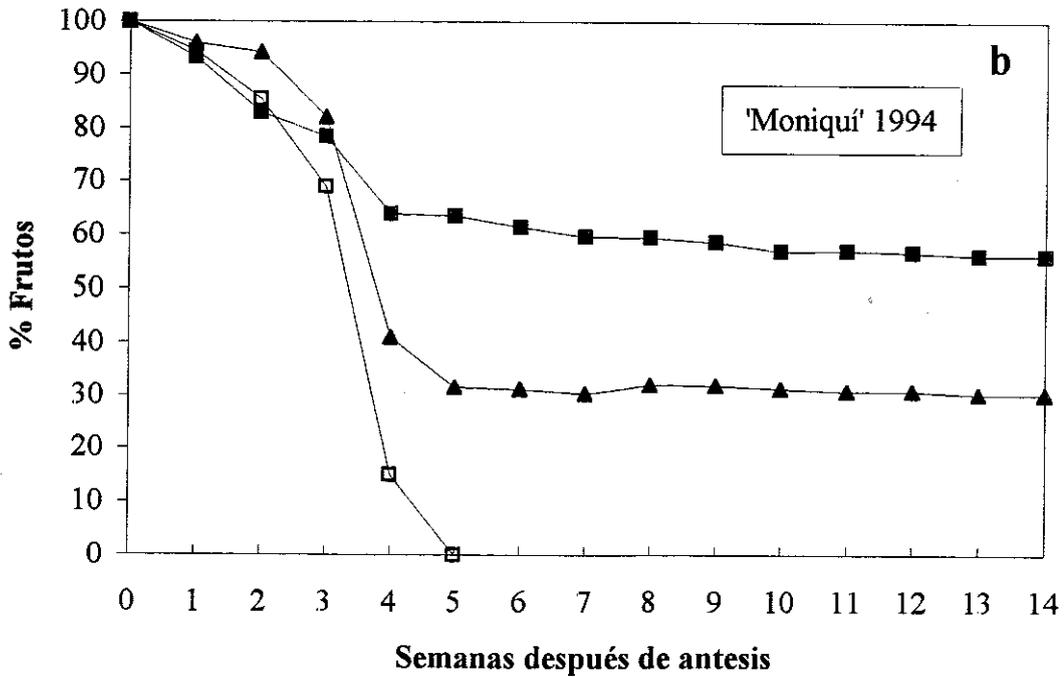
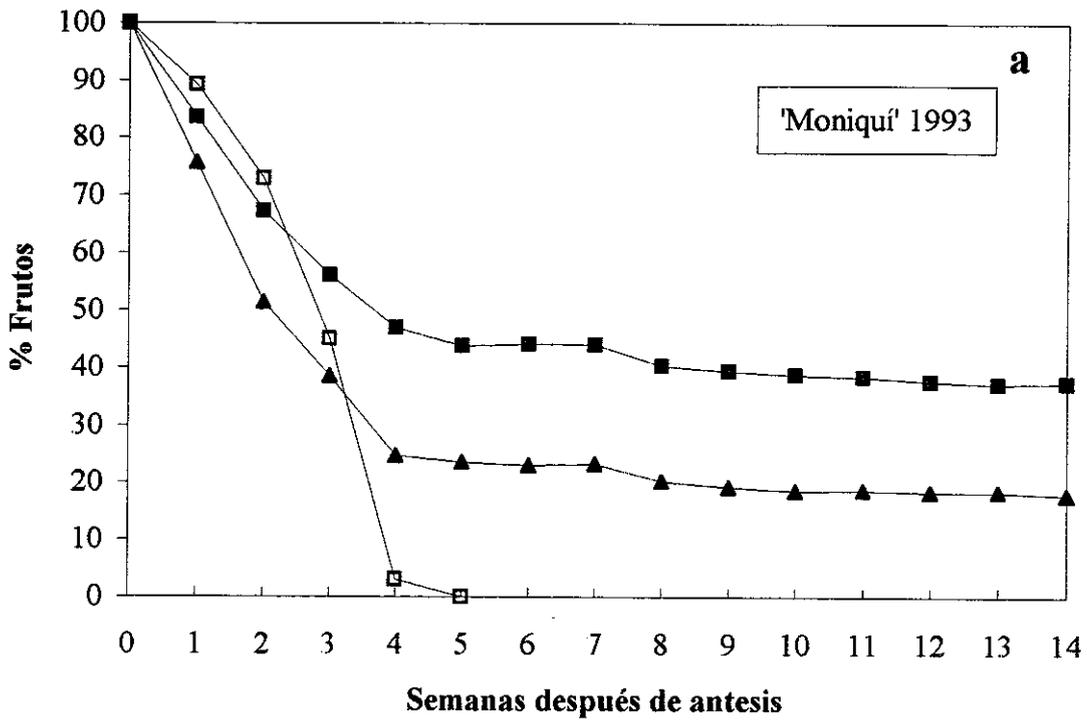


Figura 5.1: Caída de flores y frutos en el cultivar Moniquí de flores sin polinizar (□), flores polinizadas artificialmente (■) y flores de polinización libre (▲), en los años 1993 (a) y 1994 (b)

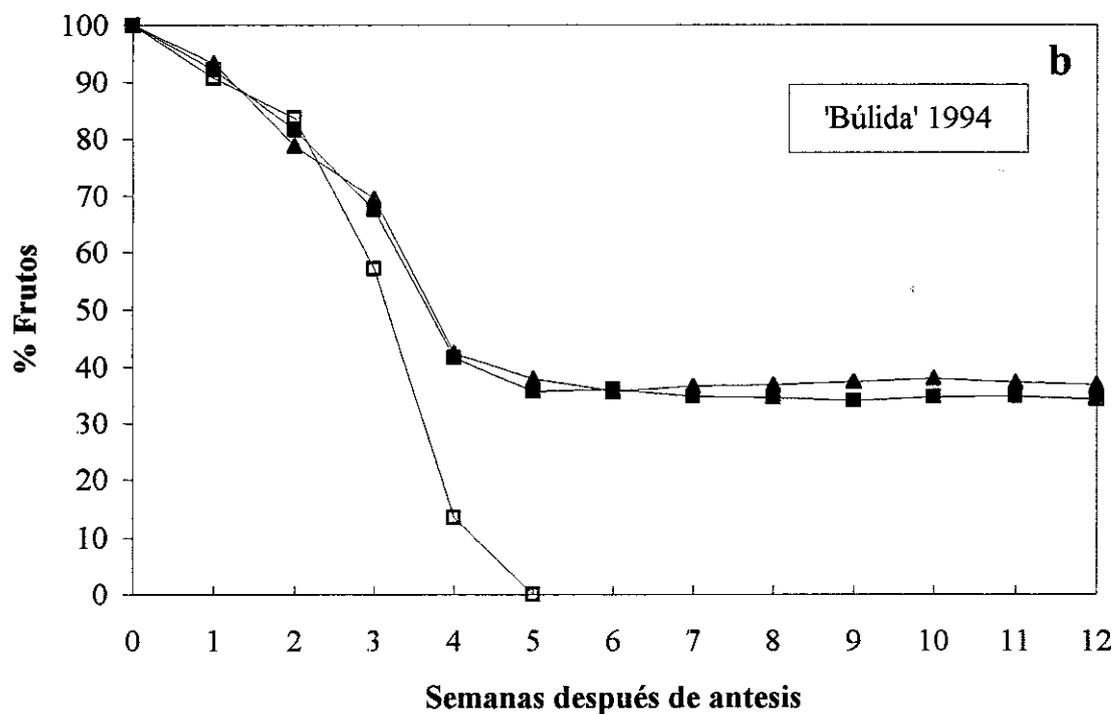
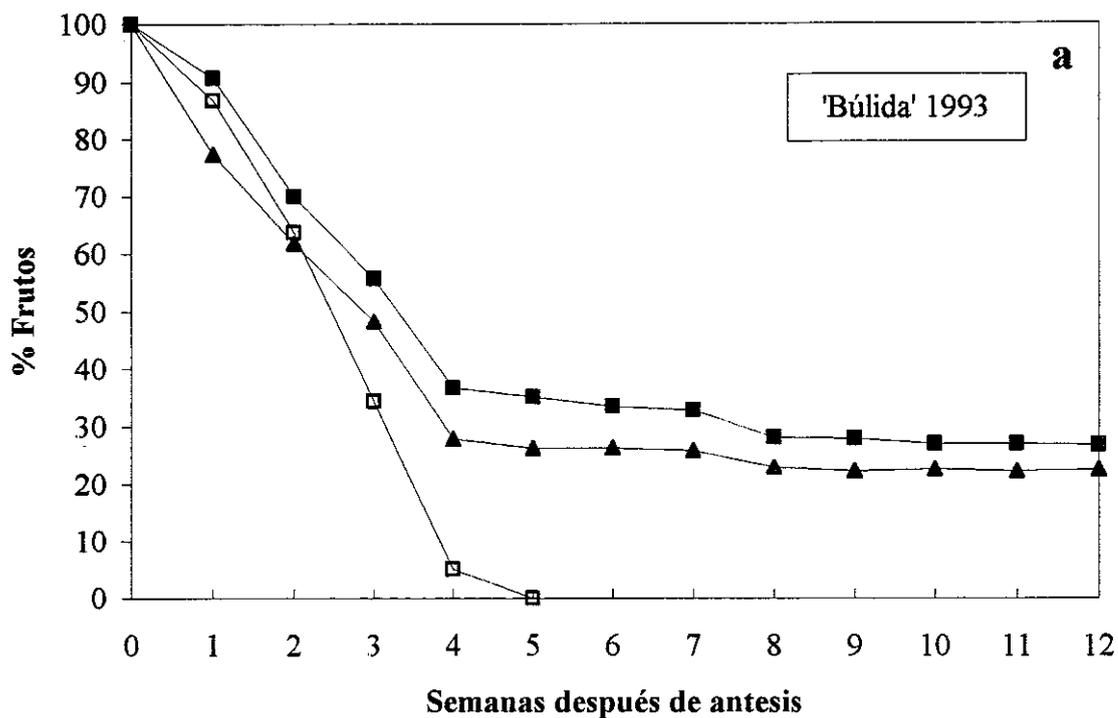


Figura 5.2: Caída de frutos en el cultivar Búlida de flores sin polinizar (□), flores polinizadas artificialmente (■) y flores de polinización libre (▲), en los años 1993 (a) y 1994 (b)

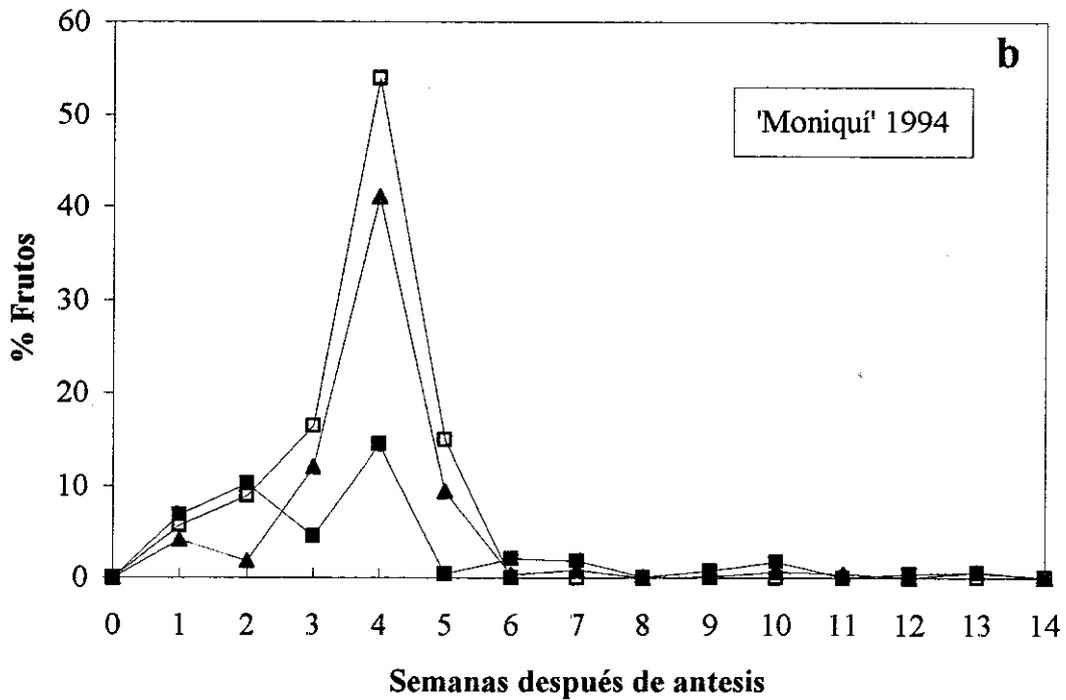
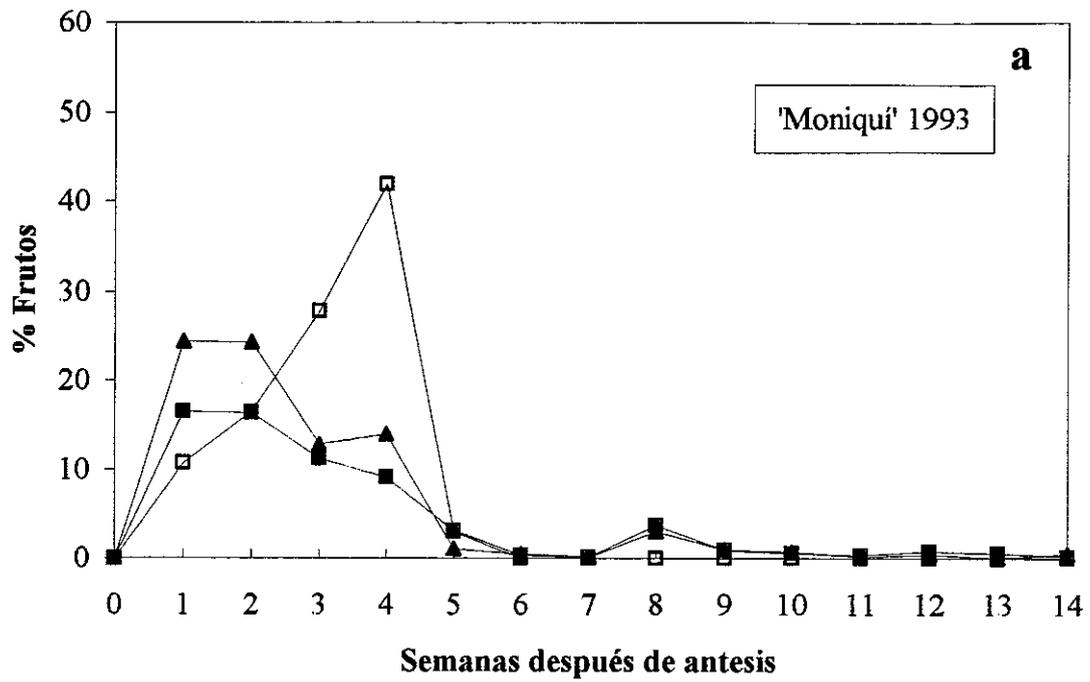


Figura 5.3: Caída relativa de frutos (% de frutos caídos cada semana) en el cultivar Moniquí de flores sin polinizar (□), flores polinizadas artificialmente (■) y flores de polinización libre (▲), en los años 1993 (a) y 1994 (b)

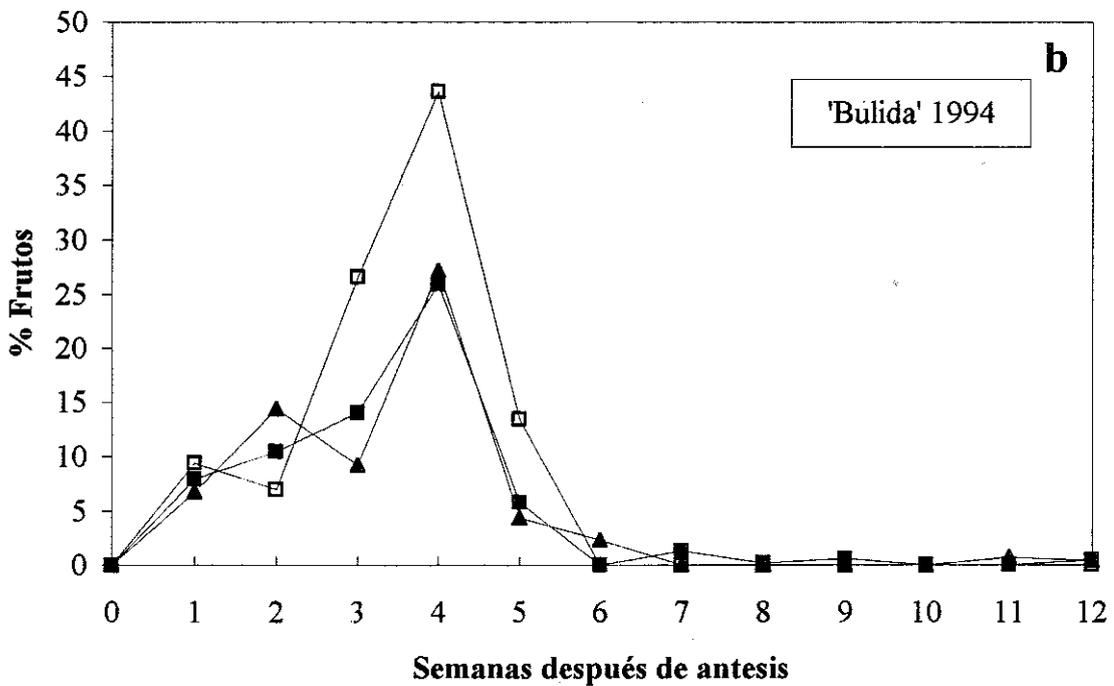
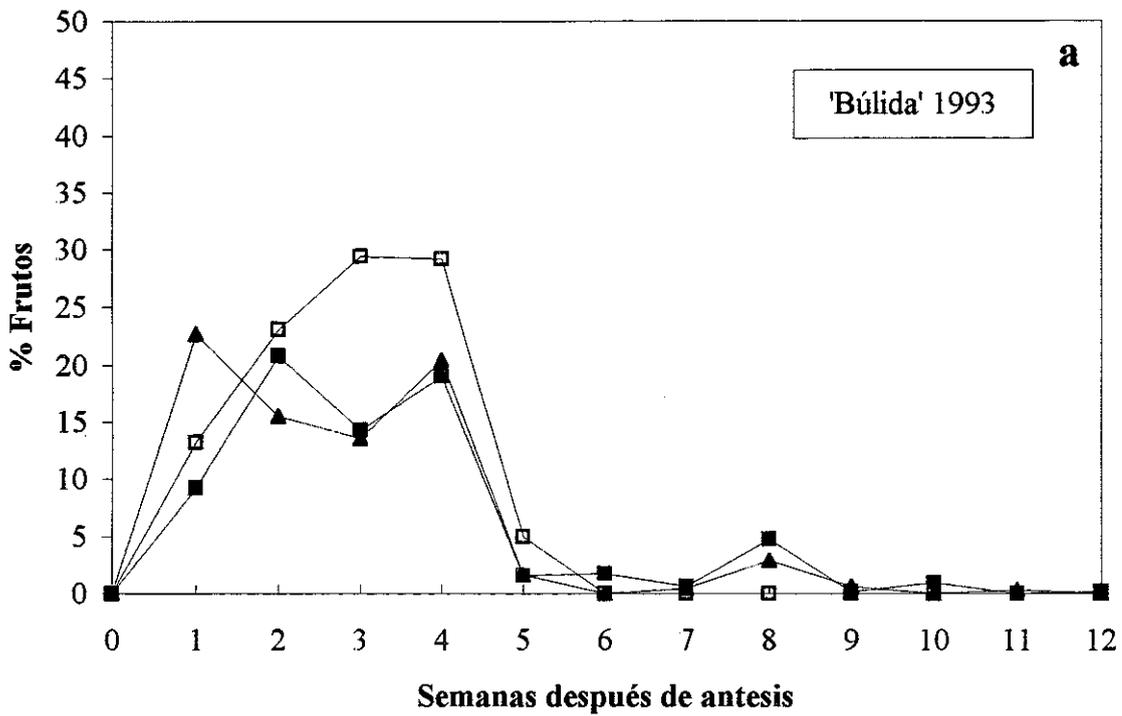


Figura 5.4: Caída relativa de frutos (% de frutos caídos cada semana) en el cultivar Búlida de flores sin polinizar (□), flores polinizadas artificialmente (■) y flores de polinización libre (▲), en los años 1993 (a) y 1994 (b).

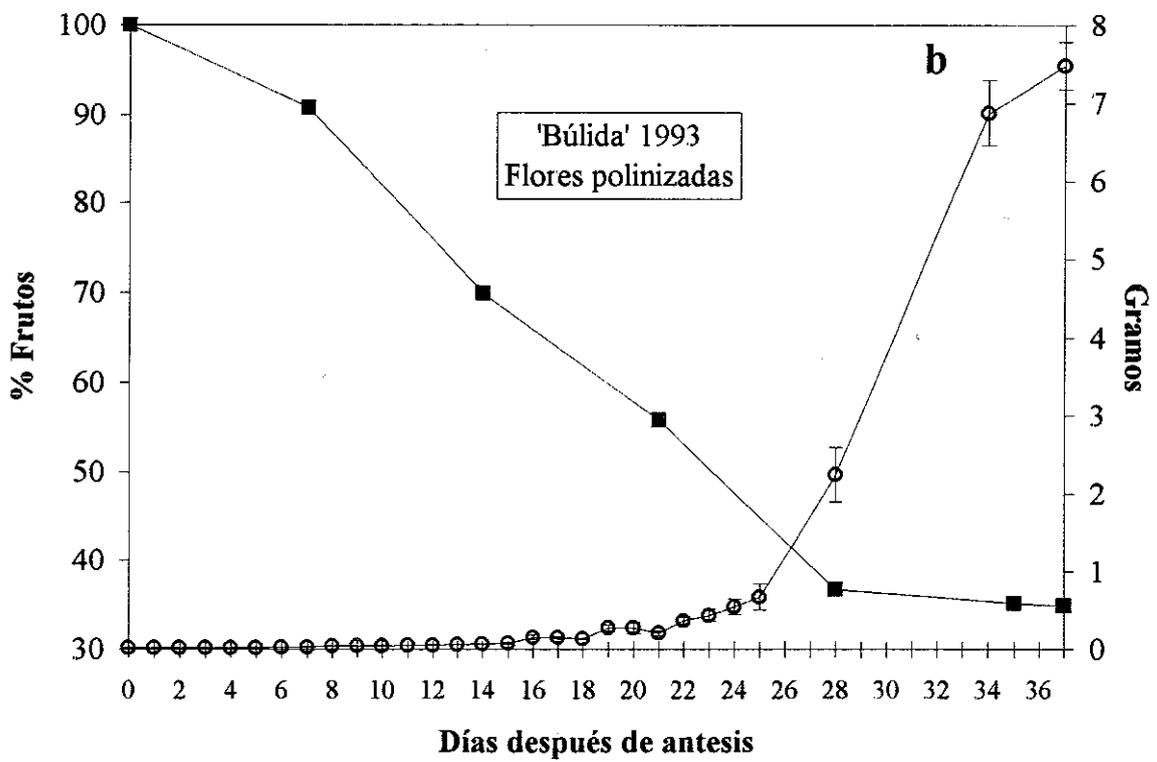
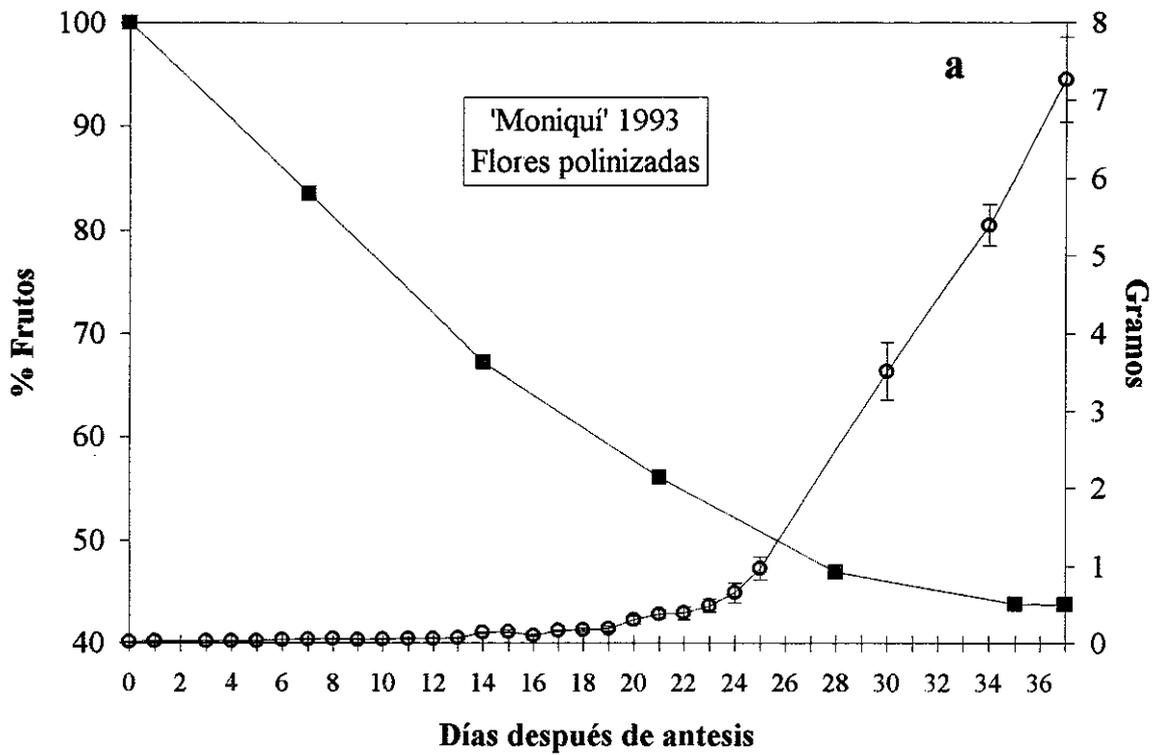


Figura 5.5: *Peso de frutos y porcentaje de cuajado en 'Moniquí' y 'Búlida'.* Peso del fruto (g, media \pm error estándar) (○) y porcentaje de cuajado de frutos (■), desde antesis hasta el establecimiento del cuajado final en flores polinizadas del cultivar Moniquí (a) y Búlida (b) en 1993.

5.3.2 Crecimiento del ovario

Con el fin de valorar si en las primeras 4 semanas después de antesis ocurren cambios en el crecimiento del ovario y de detectar los primeros indicios de fructificación, se obtuvieron las gráficas de crecimiento con los datos de los pesos individuales de las flores y los pequeños frutos en los dos cultivares durante los años 1993 y 1994.

La dinámica del crecimiento de frutos en la población de flores polinizadas presentó una separación en 2 poblaciones de flores: unas que continúan creciendo y otras que no aumentan de tamaño, acentuándose las diferencias entre ambas poblaciones con el tiempo. Este comportamiento se registró en los 2 cultivares estudiados, 'Moniquí' (Fig. 5.6) y 'Búlida' (Fig. 5.7). El análisis del proceso, y su comparación con flores no polinizadas dentro de las 2 primeras semanas, mostró el mismo comportamiento, aunque menos acentuado, existiendo un amplio rango de pesos dentro de cada día ('Moniquí', Fig. 5.8; 'Búlida', Fig. 5.9). En estas fases iniciales de la fructificación, los pesos evolucionan de forma muy similar en ambos cultivares, tanto en las flores polinizadas (Fig. 5.8a y 5.9a) como en las no polinizadas (Fig. 5.8b y 5.9b).

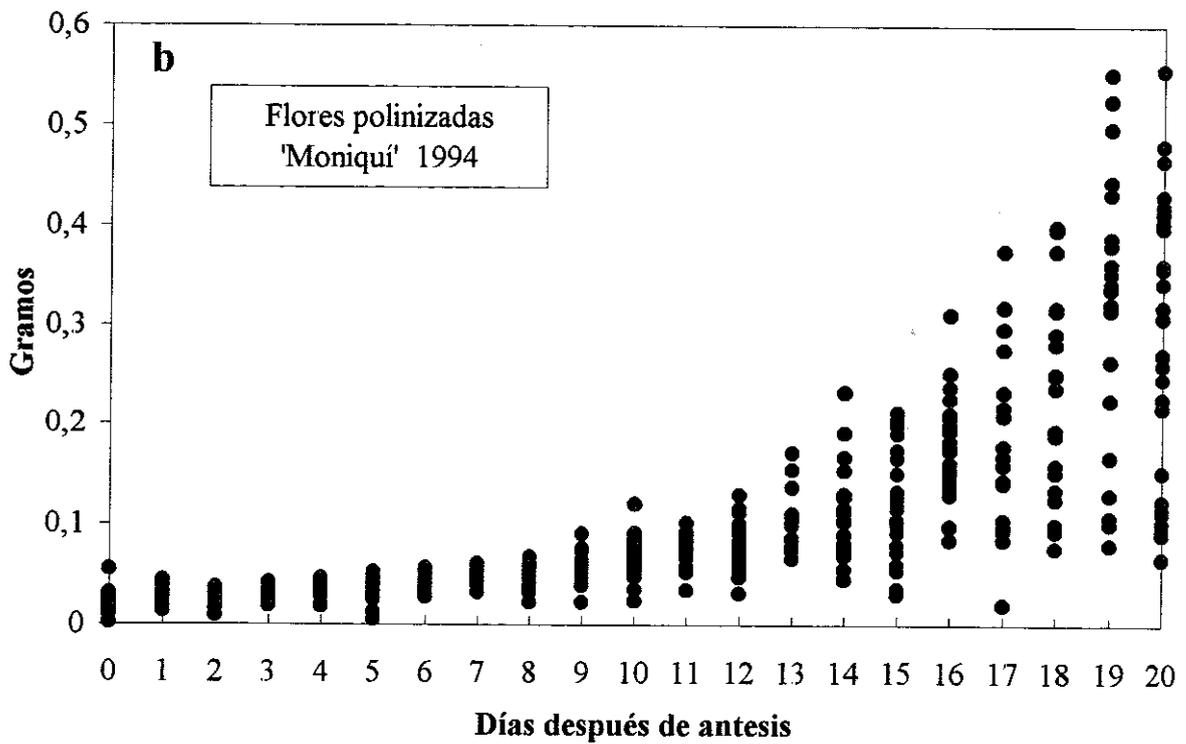
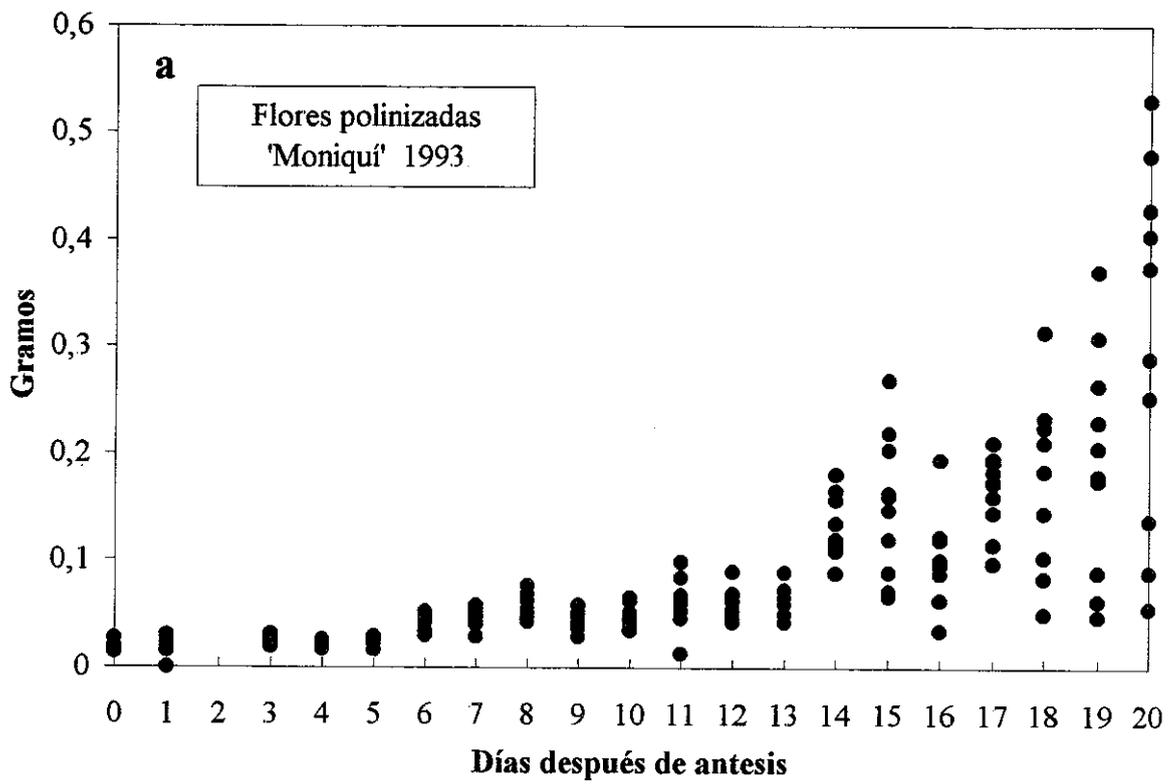


Figura 5.6: Peso de flores y frutos (g) en el cultivar Moniquí durante los primeros 20 días después de antesis en 1993 (a) y en 1994 (b) en flores polinizadas

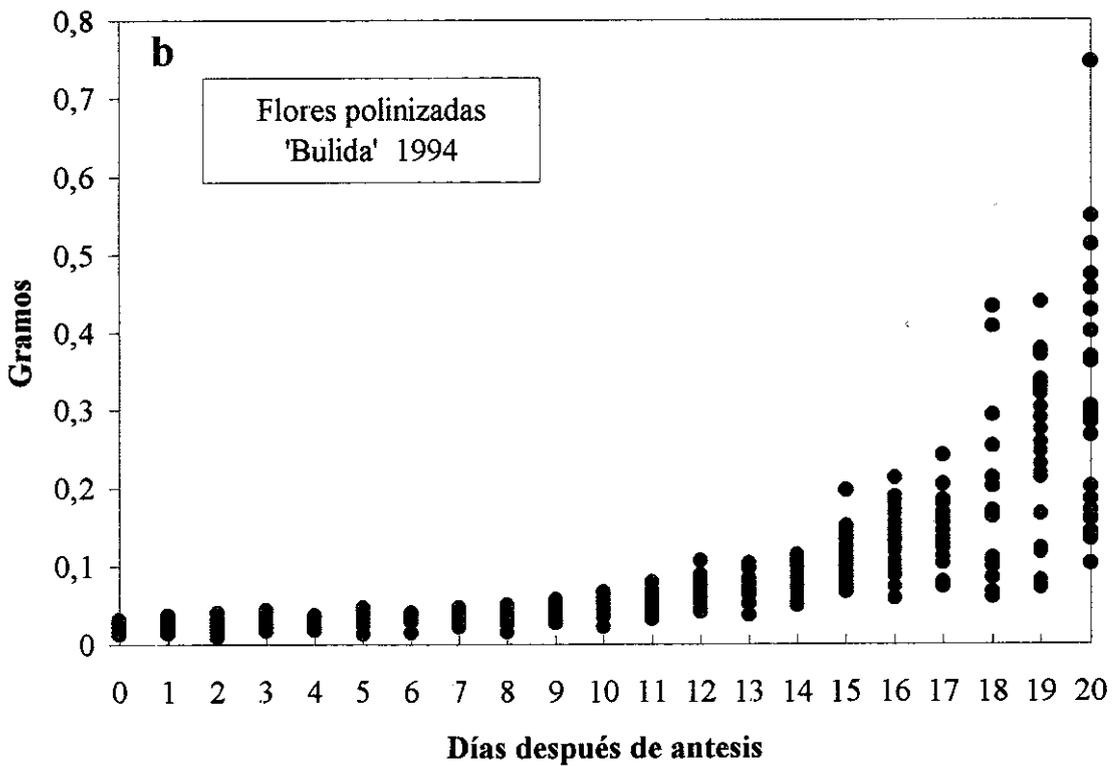
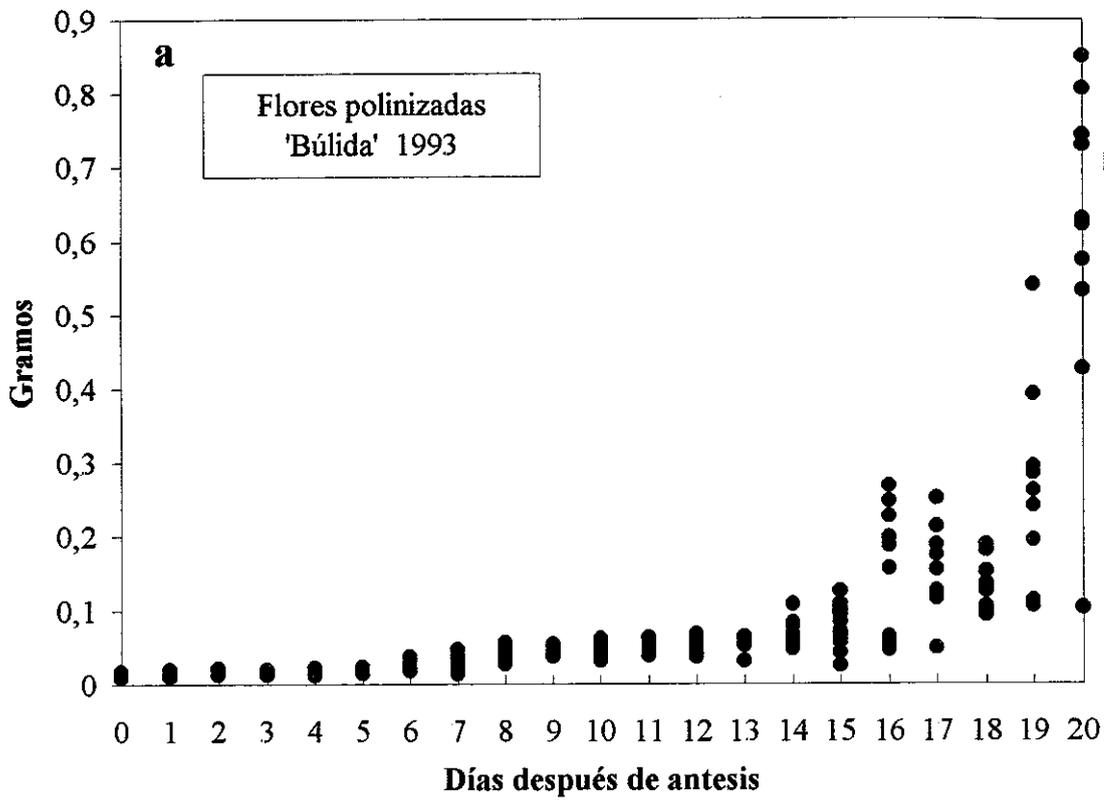


Figura 5.7: Peso de flores y frutos (g) en el cultivar Búlida durante los primeros 20 días después de antesis en 1993 (a) y en 1994 (b) en flores polinizadas

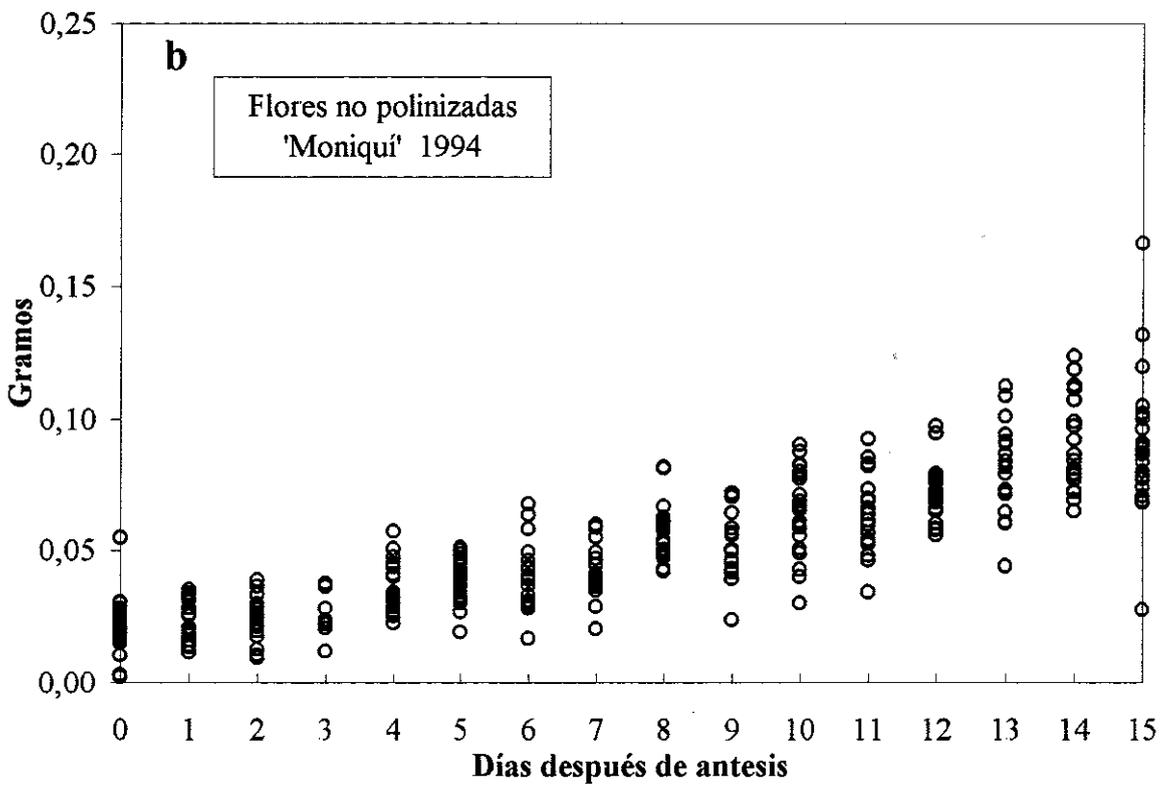
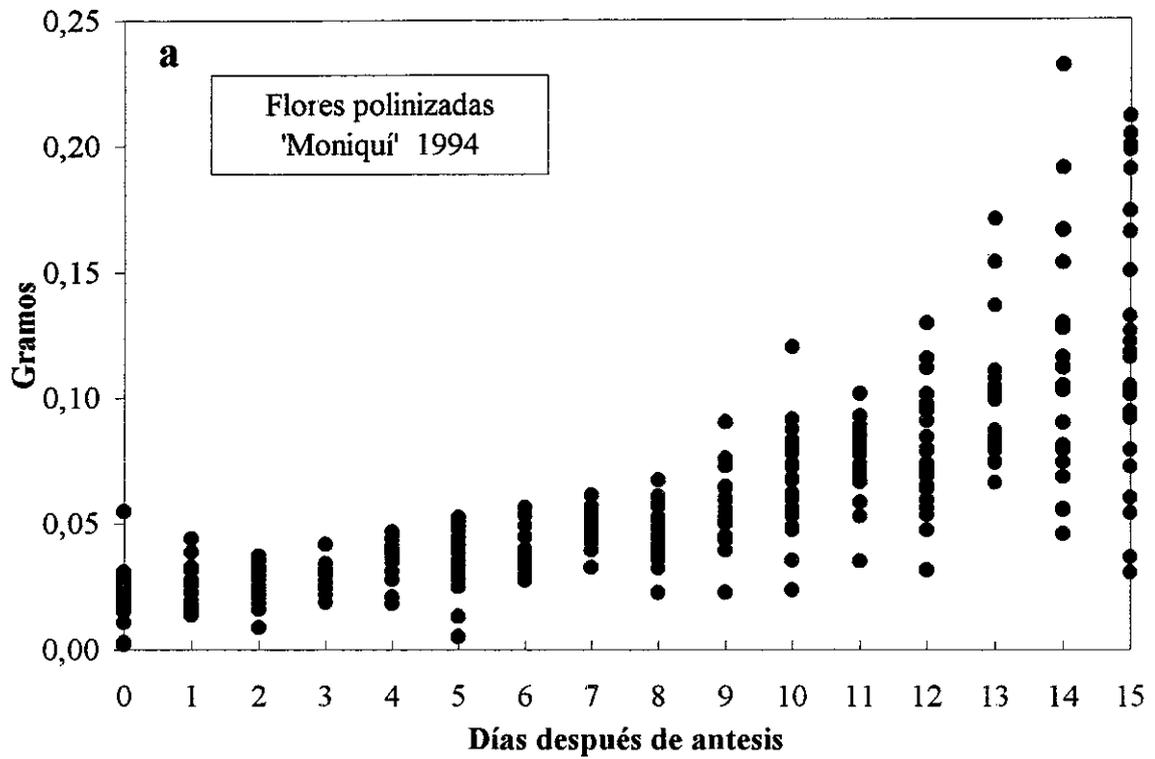


Figura 5.8: Peso de flores y frutos (g) del cultivar Moniquí durante los primeros 15 días después de antesis en 1994 a) Flores polinizadas (●). b) Flores no polinizadas (○).

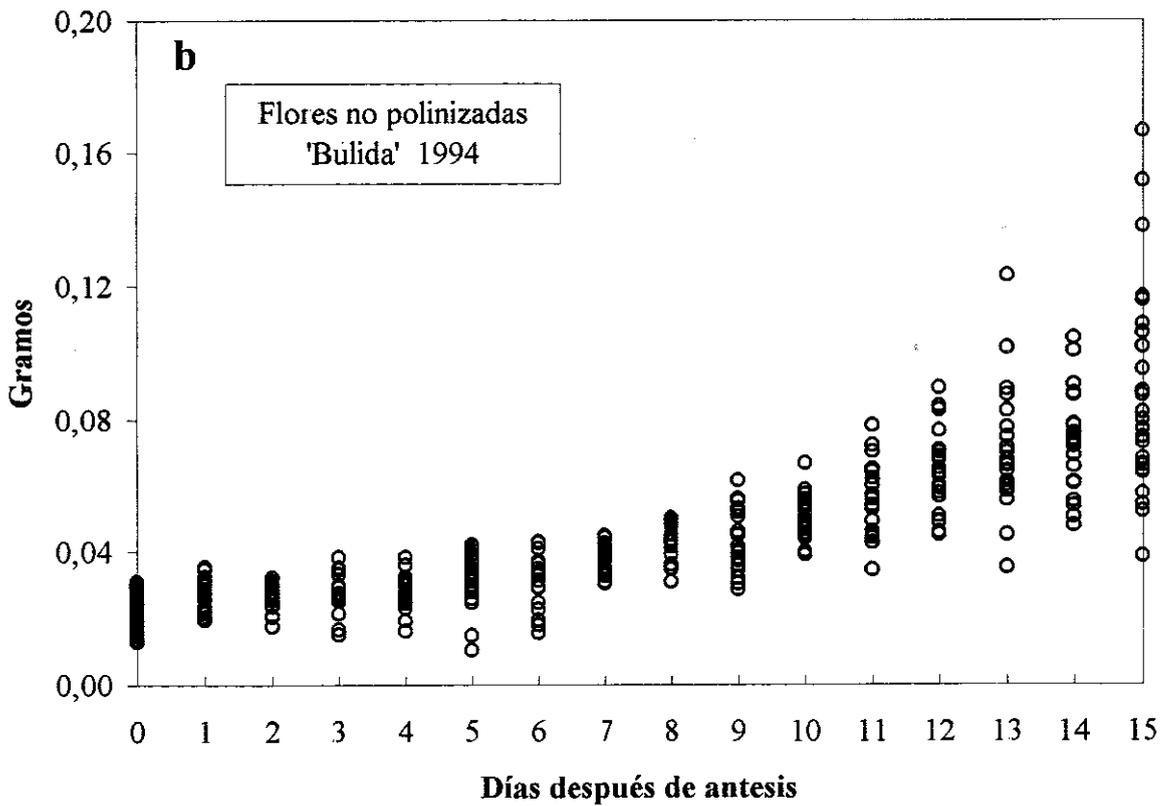
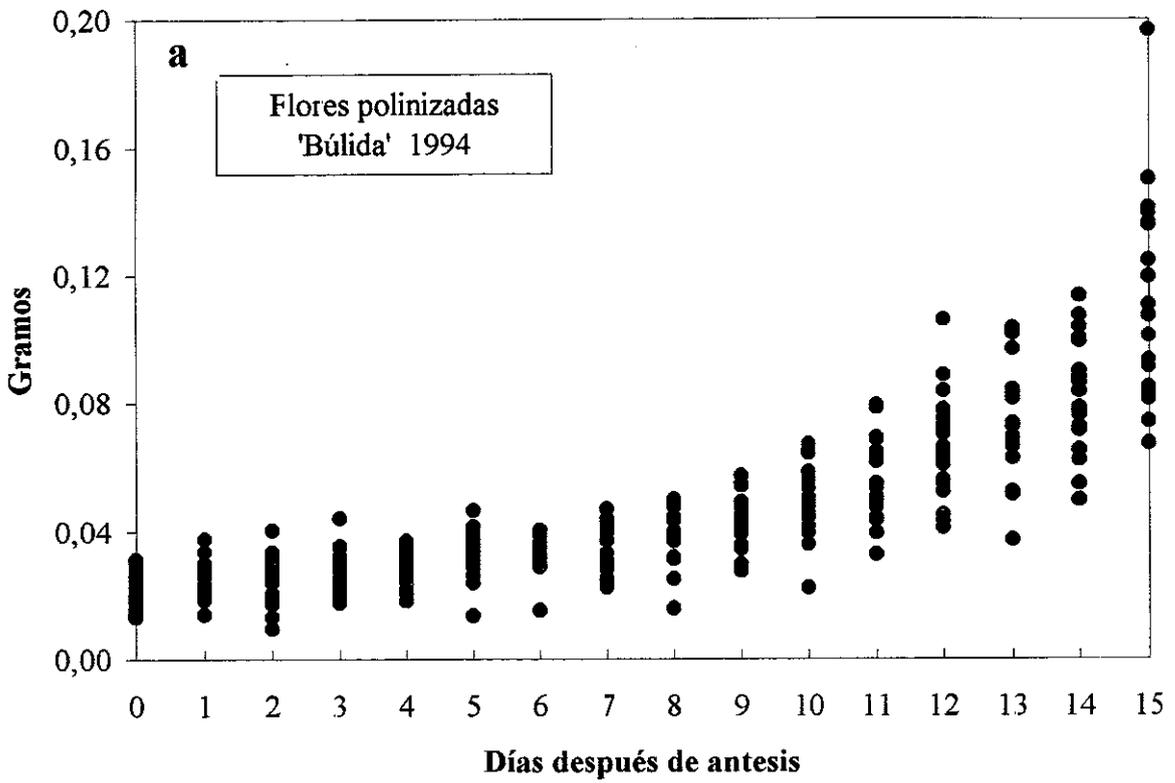


Figura 5.9: Peso de flores y frutos (g) del cultivar Búlida durante los primeros 15 días después de antesis en 1994. a) Flores polinizadas (●). b) Flores no polinizadas (○).

5.4 DISCUSION

La mayor parte de la caída de flores y frutos en albaricoquero, al igual que en otros muchos frutales (Sedgley y Griffin, 1989), tiene lugar dentro de los dos meses siguientes a antesis. En los dos cultivares estudiados, 'Moniquí' y 'Búlida', la mayoría de las flores y frutos que se caen lo hacen en las primeras 4 semanas después de la polinización. La curva de caída se ajusta a las obtenidas en otras especies de *Prunus* (Harrold, 1935; Kester y Criggs, 1959), presentando los mismos picos de caída en los años y los cultivares estudiados. El primer pico de caída se produce durante las dos primeras semanas después de antesis. En esta fase, la caída se suele atribuir a flores sin fecundar y frutos mal cuajados (Harrold, 1935). Esto se vería apoyado por el hecho de que en estas 2 primeras semanas también se produce una caída importante de flores sin polinizar. Sin embargo, en los dos cultivares y en los tres años estudiados, la caída de las flores sin polinizar no fue total durante estas 2 primeras semanas ya que un número considerable de flores continuaron su crecimiento. En el segundo pico de caída, entre la tercera y la cuarta semana después de antesis, ya se desprenden todas las flores no polinizadas junto a gran parte de las polinizadas. Los picos de caída más pronunciados en flores no polinizadas se producen con posterioridad a los de flores polinizadas. Resultados similares han sido observados en olivo y se han atribuido a una mayor competencia en la población de flores polinizadas (Rapoport y Rallo, 1991a). Los dos cultivares, 'Búlida' y 'Moniquí', siguen un comportamiento semejante excepto en la respuesta a la polinización manual: mientras que 'Búlida' responde con un porcentaje de cuajado similar tras la polinización manual que el obtenido con polinización libre, 'Moniquí' presenta un cuajado considerablemente mayor. Esto viene a avalar los resultados obtenidos en el capítulo 4, confirmando la necesidad de polinización cruzada de este cultivar y señalando a problemas de polinización como el principal responsable de los cuajados erráticos.

La práctica totalidad de la caída en los dos cultivares estudiados tiene lugar en las primeras cuatro semanas después de antesis, produciéndose con anterioridad al momento en que el crecimiento del fruto sufre un aumento considerable de tamaño. Por lo tanto, los frutos se caen inmediatamente antes de una fase intensa de desarrollo (Stephenson, 1981).

En las curvas de crecimiento de frutos se observa la evolución de dos poblaciones, una de flores que continúan creciendo y otra de flores que no aumentan de tamaño. Estas poblaciones podrían corresponderse con el grupo de flores que van a permanecer en el árbol y con el de las que se van a caer. En melocotonero (Harrold, 1935), aguacate (Sedgley, 1980) y pacanero (Yates y Sparks, 1994), no se han encontrado diferencias morfológicas externas entre las flores y frutos que se caen y los que permanecen en el árbol. Sin embargo, las flores y frutos antes de caer detienen su crecimiento, tanto a nivel de desarrollo del ovario como de tejidos ovulares (Rapoport y Rallo, 1991b; Yates y Sparks, 1994). La separación en dos poblaciones de las flores polinizadas se aprecia a partir de la tercera semana. Sin embargo, durante los primeros 15 días después de antesis, ya se observan diferencias de pesos dentro de cada día, existiendo flores que crecen rápidamente y otras que no aumentan de tamaño. Al producirse tanto en flores polinizadas como en no polinizadas, estas diferencias entre flores no parecen deberse a la polinización.

La caída prematura de frutos se ha asociado a competencia entre brotes y frutos (Quinlan y Preston, 1971) y entre frutos (Stephenson, 1981), distintos tipos de estrés (Sedgley y Griffin, 1989), efectos hormonales (Luckill, 1953), interrupción del suministro de metabolitos (Sanz *et al.*, 1987) y efectos de dominancia apical y de las flores ya fecundadas (Sedgley y Griffin, 1989). Sin embargo, todavía se desconoce el motivo por el cual unas flores o frutos se desprenden mientras otros se mantienen en el árbol (Charlesworth, 1989a). Los resultados de este trabajo muestran que para el desarrollo del fruto es indispensable que se haya completado con éxito la fecundación, pero el hecho de que durante las primeras semanas la caída de flores no polinizadas se distribuya de forma similar a la caída de las flores polinizadas, parece indicar que en las fases iniciales del desarrollo del fruto el patrón de caída es independiente de la fecundación, y que por tanto debe estar condicionado por factores intrínsecos a la flor. Esto coincide con lo observado en otras especies, en las que el nivel de cuajado no parece depender únicamente de condiciones externas (Lloyd, 1980; Stephenson, 1992; Guitián *et al.*, 1996). Factores inherentes a la flor podrían explicar las diferencias de peso, cuajado, proporción de óvulos viables y duración del período efectivo de polinización encontradas entre flores pertenecientes a ramas de distinta orientación en manzano (Robbie *et al.*, 1993) y el engrosamiento del ovario en flores no polinizadas de varias especies frutales (Badr y Crane, 1965; Sedgley, 1980; Rapoport y Rallo, 1991a). La

distribución de recursos se ha apuntado como determinante en el establecimiento del cuajado (Marshall y Watson, 1992; Guitián *et al.*, 1996), mientras que la falta de reservas de almidón se ha relacionado con la degeneración de óvulos (Arbeola y Herrero, 1991), lo que lleva a pensar que las reservas presentes en el interior de la flor pueden jugar un papel importante en el cuajado. La transformación de una flor en fruto requeriría, por un lado, la fecundación y, por otro, un adecuado estado nutritivo, siendo ambos factores necesarios para el éxito del proceso reproductivo. La diferencia en el estado nutritivo de las flores podría ser la causa de la caída o permanencia de flores y frutos. De esta manera, las flores con menos recursos no aumentarían de tamaño, siendo incapaces de continuar su desarrollo y, finalmente, se desprenderían. La evaluación del contenido de almidón dentro de las distintas estructuras florales podría esclarecer la implicación de los factores nutritivos en el cuajado de frutos.

6. EVALUACION DEL CONTENIDO DE ALMIDON
MEDIANTE ANALISIS DE IMAGEN

6. EVALUACION DEL CONTENIDO DE ALMIDON MEDIANTE ANALISIS DE IMAGEN

6.1 INTRODUCCION

El almidón es el principal componente de las reservas de las plantas leñosas (Chapin *et al.*, 1990). En muchas especies se han caracterizado cambios en el contenido de almidón en distintas escalas temporales, desde intervalos de pocas horas en hojas hasta variaciones estacionales (Chaumont *et al.*, 1994). Estas variaciones juegan un importante papel como indicadores de las relaciones de intercambio entre fuentes y sumideros (Ho, 1988), estando por tanto muy relacionados con los cambios en la actividad fisiológica de órganos y tejidos (Smith *et al.*, 1992).

El gran número de funciones del almidón dentro del ciclo de vida de las plantas ha provocado el desarrollo de diversas técnicas cuyo objetivo común es la medida del contenido de almidón. Los métodos extractivos permiten su expresión como el porcentaje sobre el peso seco de diferentes tejidos. Sin embargo, los carbohidratos no estructurales como el almidón a menudo se encuentran en tejidos que representan una pequeña proporción del conjunto de la planta (Kozlowski, 1992), por lo que el porcentaje sobre el peso seco puede no reflejar el contenido de almidón de determinadas zonas pequeñas de la planta. También se han empleado otras técnicas analíticas que detectan claras diferencias cuantitativas asociadas a procesos fisiológicos. Con ese fin se emplean métodos enzimáticos (Vikman y Vessey, 1993) y colorimétricos (Buysse y Merckx, 1993), pero requieren grandes cantidades de tejido, lo que provoca que no siempre sean utilizables, ya que las reservas de carbohidratos a menudo se encuentran compartimentalizadas en la planta (Watson y Casper, 1984), de tal forma que el crecimiento puede tener lugar en estructuras individuales (Sprugel *et al.*, 1991), siendo la distribución de fotoasimilados sustancialmente diferente de un órgano receptor a otro (Ho, 1988). En las estructuras reproductivas, esta compartimentalización puede estar altamente especializada, tanto a nivel inflorescencia (Gutián, 1994), como en el interior del pistilo, donde se han observado grandes diferencias en el nivel de almidón entre grupos de células cercanos, desarrollando cada uno de ellos una función y utilizando su almidón en un determinado momento de su desarrollo (Herrero y Dickinson,

1979; Arbeloa y Herrero, 1991) El uso en estas zonas concretas de la planta de los métodos de detección de almidón mencionados anteriormente puede no ser adecuado, al mezclar unas zonas con otras. Sin embargo, estas diferencias pueden ser observadas con facilidad en el microscopio con técnicas histoquímicas, como el uso de *PAS* (*Periodic acid Schiff's reagent*), que tiñe carbohidratos insolubles (Feder y O'Brien, 1968) o, de manera más específica, con la tinción del almidón con I_2KI (Johansen, 1940). No obstante, esta detección del almidón tiene la desventaja de que, mientras la determinación de su presencia o ausencia es sencilla, resulta imposible cuantificar diferencias entre distintos niveles de contenido de almidón, pudiéndose realizar únicamente comparaciones groseras

Como alternativa a esta situación, se podría utilizar un analizador de imagen en combinación con las técnicas histoquímicas mencionadas. El uso del análisis de imagen ha resultado útil en el estudio cuantitativo de variaciones de distintos compuestos (Kelly *et al.*, 1991, Renaudin *et al.*, 1991, Zhong *et al.*, 1995), en la cuantificación de la radiación recibida en células foliares (Myers *et al.*, 1994), en la evaluación de reacciones de hibridación *in situ* (Ray *et al.*, 1994) o en la detección de la actividad de un microelemento determinado (Malho *et al.*, 1995).

El principal objetivo de este ensayo es el desarrollo de una técnica capaz de comparar de forma reproducible y objetiva distintos contenidos de almidón en distintas estructuras de la flor, como los óvulos, donde la distribución del almidón se encuentra muy compartimentalizada (Arbeloa y Herrero, 1991). Paralelamente se han comparado dos tinciones, *PAS* e I_2KI , y dos medios de inclusión, parafina y una resina sintética (JB4), con el fin de determinar el método más adecuado.

6.2. MATERIALES Y METODOS

6.2.1. Preparación del material para el microscopio

Se usaron flores del cultivar Moniquí (Capítulo 2) en todos los tratamientos. Para la inclusión en parafina, los pistilos se fijaron en FAA, se deshidrataron en una serie de alcohol butílico terciario y, finalmente, se incluyeron en parafina (Jensen, 1962). Para la inclusión en resina sintética, los pistilos se fijaron en una solución al 2,5% de glutaraldehído en tampón fosfato 0,03 M, se deshidrataron en una serie de alcohol etílico y se incluyeron en resina sintética JB4 (Polysciences Inc,

Warrington, Pensilvania, Estados Unidos). En ambos casos se siguieron los procedimientos descritos en el capítulo 2

Una vez incluido el material, se realizaron los cortes para su observación al microscopio. Los bloques de parafina se cortaron en un microtomo de rotación, se desparafinaron e hidrataron, mientras que los bloques de resina sintética se cortaron en un ultramicrotomo y se montaron sobre portaobjetos recubiertos de gelatina (Capítulo 2)

Los dos tipos de preparaciones se tiñeron para almidón durante 5 min con I₂KI (Johansen, 1940) y con PAS para carbohidratos insolubles (Feder y O'Brien, 1968) (Capítulo 2).

6.2.2. Análisis de imagen

Una vez teñidas, las preparaciones se observaron en un microscopio Leitz Ortholux 2. Las imágenes fueron captadas mediante una cámara en color Cohu 8310 RGB conectada al microscopio y procesadas usando un analizador de imagen Quantimet 570 Image Analysis System (Leica Cambridge, Cambridge, Reino Unido).

Se desarrollaron tres subprogramas (Apartado 12.1) con el objetivo final de evaluar el contenido de almidón de las imágenes elegidas: uno para calibrar el sistema, otro para calibrar la densidad óptica y otro para la evaluación de la densidad óptica de la imagen correspondiente al almidón teñido. Estos tres subprogramas se ensamblaron en una única rutina (Fig 6.1a).

Para calibrar el sistema hay que considerar que los niveles de detección en un analizador de imagen dependen de tres factores: las condiciones de luz, la intensidad de la tinción y los aumentos del objetivo utilizado. Por lo tanto, para poder obtener comparaciones válidas entre diferentes preparaciones, estas tres condiciones han de permanecer iguales en todas las secciones evaluadas. Para conseguirlo, al principio de cada sesión de medida se fijaron la intensidad de la luz, el brillo y el contraste, de forma que el color negro se correspondiera con el nivel de gris mínimo (NG) ≈ 0 y que un campo sin tejido de una preparación teñida lo hiciera con el nivel de gris máximo (NG ≈ 255). Una vez fijadas las condiciones de luz, el sistema fue calibrado para obtener valores de densidad óptica (DO) válidos. En primer lugar se midió la densidad óptica de la imagen en blanco y negro



correspondiente al campo sin tejido y ese valor se estimó como el correspondiente a una transmitancia (T) = 100%. Como $DO = 2 - \log T$, para $T = 100$, $DO = 0$. Posteriormente se midió el nivel de gris de la misma preparación pero con un filtro 4N, que reduce la cantidad de luz a una cuarta parte ($DO = 2 - \log T/4 = 0,6$) obteniendo con estos dos valores la recta de calibrado (Fig. 6.1b). Para el calibrado de la densidad óptica se desarrolló el segundo subprograma, capaz de transformar los valores de nivel de gris obtenidos en el primero en valores de densidad óptica (Fig. 6.1c).

Finalmente, se elaboró un tercer subprograma para evaluar el contenido de almidón de las imágenes mediante la medida de la densidad óptica de la imagen en blanco y negro correspondiente al almidón. Para medir exclusivamente la zona de la imagen correspondiente a los gránulos de almidón, fue necesario crear una imagen binaria que cubriera únicamente al tejido teñido. Para ello, el analizador tiene que poder detectar inequívocamente el almidón del resto de tejido. La manera más fiable de conseguirlo es trabajando sobre la imagen en color original, ya que en estas condiciones los gránulos de almidón contrastan suficientemente con el resto de la preparación y permiten ser reconocidos por el analizador. El sistema identifica cada color como la combinación de tres colores: rojo, verde y azul, cada uno de ellos con 255 niveles de intensidad. La combinación correspondiente al almidón se determinó aumentando manualmente el nivel de cada uno de los colores hasta que la imagen binaria obtenida (máscara) reflejaba única y totalmente el almidón observado al microscopio y en la imagen digitalizada. Se realizaron múltiples comparaciones en distintas secciones hasta fijar unos niveles válidos para todas ellas, que fueron almacenados para su utilización en todas las medidas. 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 pixels de la imagen que quedan cubiertos por la máscara (Fig. 6.1d). La suma de la DO de cada pixel se consideró como el valor correspondiente al contenido de almidón del campo medido. Todas las medidas se realizaron en campos de igual superficie ($1337 \mu\text{m}^2$).

El ensayo se realizó sobre 3 zonas del óvulo próximas entre sí pero con diferente contenido de almidón: los tegumentos, el extremo micropilar de la nucela y la zona de la nucela próxima al saco embrionario. Se tomaron medidas en 3 secciones consecutivas para obtener 3 repeticiones de cada medida, tras lo cual las muestras se lavaron y el sistema se desconectó. Se volvieron a medir las mismas

secciones en 2 nuevas sesiones, tiñendo las preparaciones y calibrando de nuevo el sistema en cada una de ellas hasta obtener tres medidas diferentes de cada campo.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (*ANOVA*) con dos factores de variación: la zona del óvulo examinada y la sesión de medida. Cuando el *ANOVA* generó diferencias significativas ($p < 0,001$), las medias se compararon según el test de Duncan.

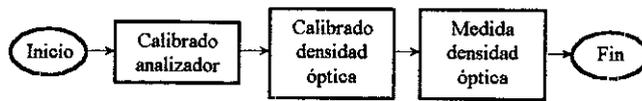
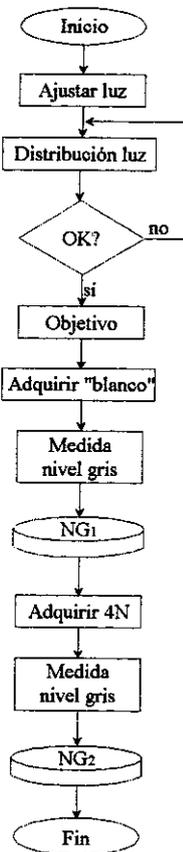
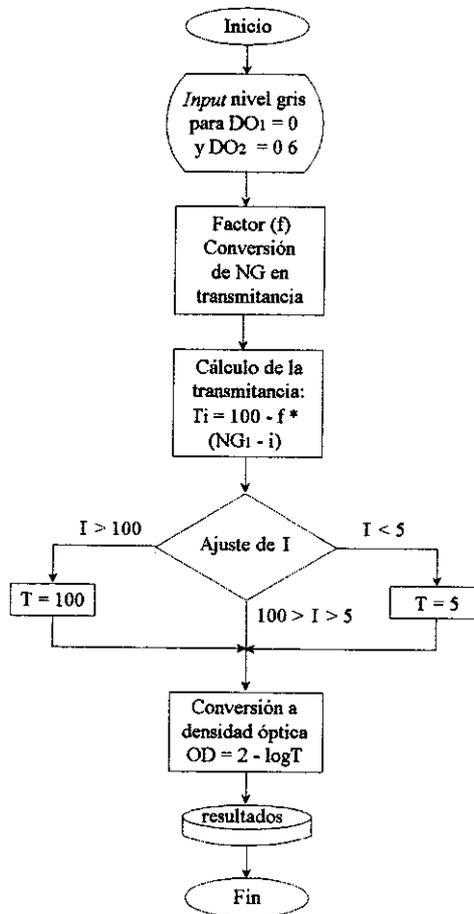
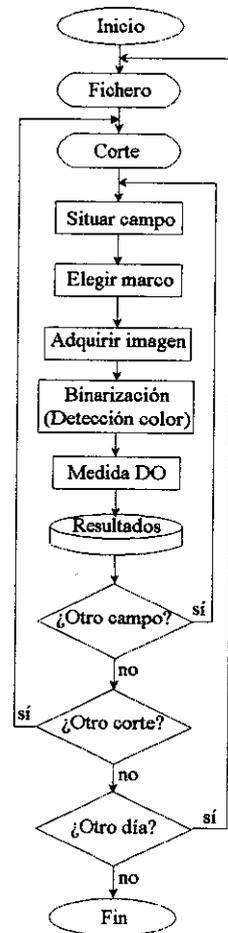
a**Esquema general****b****Calibrado analizador de imagen****c****Calibrado Densidad óptica****d****Medida Densidad óptica**

Figura 6.1: Diagramas de flujo de los programas utilizados en la evaluación del contenido de almidón (a) Esquema general del proceso (b) Calibrado del sistema de análisis de imagen. (c) Calibrado de la densidad óptica. (d) Cuantificación de la densidad óptica de las imágenes obtenidas. NG, nivel de grises; I, transmitancia; DO, densidad óptica; 4N, filtro reductor de la cantidad de luz a una cuarta parte.

RESULTADOS Y DISCUSION

Aunque el almidón es detectado por las dos tinciones, se observan claras diferencias entre ellas. Con *PAS*, además del almidón, se tiñen el resto de carbohidratos insolubles (Feder y O'Brien, 1968), incluyendo la celulosa de las paredes celulares (Fig 6 2a y 6 2b), lo que dificulta en gran manera la detección del almidón por el analizador de imagen. Por el contrario, cuando las secciones se tiñen con I_2KI , únicamente el almidón es detectado, con un claro contraste sobre el resto del tejido (Fig 6 2c y 6 2d), lo que permite mediciones fiables con el analizador de imagen. Sin embargo, el uso de I_2KI , aún siendo muy específico, presenta el inconveniente de no ser una tinción estequiométrica, ya que la reacción de tinción se produce al acumularse yodo en el centro de la molécula helicoidal de almidón, cuya longitud es muy variable (Jensen, 1962). Por lo tanto no es posible cuantificar el contenido exacto de almidón en el tejido. No obstante, las distintas intensidades de la tinción reflejan con claridad el contenido de almidón presente en el tejido, por lo que sí se pueden cuantificar los cambios entre los campos examinados (Herrero y Dickinson, 1979). De la misma forma se pueden cuantificar las diferencias entre las medidas obtenidas entre grupos de células próximos (Fig 6 2e, 6 2f y 6 3). Estas diferencias son reproducibles por el sistema en sesiones independientes de medida. Mientras se obtienen diferencias significativas ($p < 0,01$) entre las distintas regiones evaluadas, no se observan diferencias entre las distintas sesiones de medida (Fig 6 3; Tabla 6 1).

Los dos medios de inclusión empleados, parafina y resina sintética JB4, resultaron válidos. Aunque los cortes obtenidos en JB4 producen una imagen más definida (Berlyn y Miksche, 1976), se pudieron obtener imágenes de suficiente calidad a partir de los cortes parafinados. Ya que es necesario realizar múltiples cortes, la inclusión en parafina resulta mucho más rápida y económica que la inclusión en JB4, permitiendo la obtención de los cortes de forma consecutiva (Berlyn y Miksche, 1976), lo que posibilita la medida de la misma estructura en cortes distintos.

El método descrito no es destructivo para las muestras, por lo que se pueden realizar medidas morfométricas de las muestras en los mismos cortes y posteriormente se pueden emplear otras tinciones al lavarse el I_2KI . Todos los pasos del proceso están programados (Apartado 12 1), con instrucciones y

aclaraciones en pantalla, lo que permite su utilización por cualquier usuario que únicamente debería fijar las condiciones de luz al principio de cada sesión. Además, los resultados son fácilmente analizables al obtenerse en formato ASCII, pudiendo ser exportados a cualquier hoja de cálculo.

Por último, el método podría aplicarse al estudio de las diferencias cuantitativas en el contenido de almidón en otros tejidos vegetales con un previo ajuste de los niveles de color en función del fondo de las preparaciones. Podría ser de utilidad a la hora de examinar la relación entre las reservas de carbohidratos de órganos concretos o tejidos y su actividad fisiológica. Se han registrado cambios en el contenido de almidón dentro de importantes procesos fisiológicos, como en germinación de semillas (Dennis y Miernyk, 1982), actividad fotosintética (Roper *et al.*, 1988), funciones de almacenamiento (Smith *et al.*, 1995), proceso reproductivo (Herrero y Dickinson, 1979, Arbeloa y Herrero, 1991), y control de apertura de estomas (Outlaw y Manchester, 1979; Pemadasa, 1981). Por lo tanto, la cuantificación de diferencias en el contenido de almidón por medio de análisis de imagen puede ser una herramienta eficaz en el estudio del desarrollo de procesos en los que intervengan cambios en estructuras más o menos compartimentalizadas.

Figura 6.2: *Vistas de un óvulo a través del analizador de imagen. Las flechas señalan gránulos de almidón*

- (a) Vista del extremo micropilar de la nucela. Corte de material incluido en JB4 ($2\ \mu\text{m}$) y teñido con PAS. x 560. Barra = $10\ \mu\text{m}$
- (b) Máscara obtenida por el analizador de imagen correspondiente a la reacción PAS de la imagen anterior, incluyendo el almidón y las paredes celulares x 560. Barra = $10\ \mu\text{m}$
- (c) Vista de la región superior de la nucela. Corte de material incluido en parafina ($10\ \mu\text{m}$) y teñido con I_2KI x 560. Barra = $10\ \mu\text{m}$.
- (d) Máscara obtenida por el analizador de imagen correspondiente a la porción de la imagen anterior teñida con I_2KI , incluyendo únicamente almidón x 560. Barra = $10\ \mu\text{m}$
- (e) Vista al microscopio de un corte de óvulo teñido con I_2KI . Los recuadros indican la región estudiada con el analizador de imagen x 224. Barra = $50\ \mu\text{m}$
- (f) Detalle del corte anterior. x 560. Barra = $20\ \mu\text{m}$

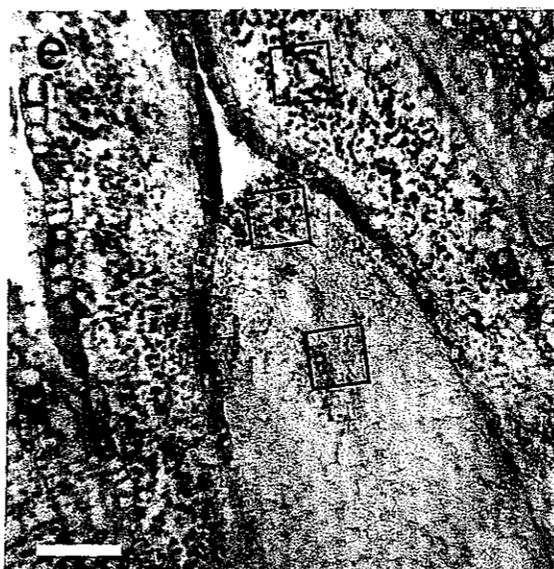
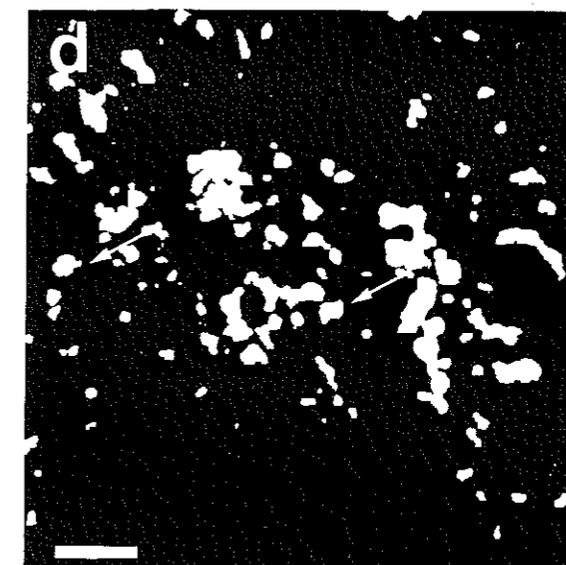
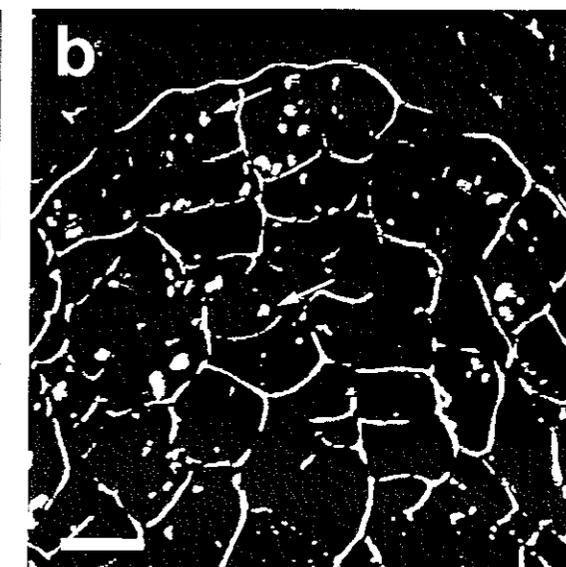


Tabla 6.1. Análisis de varianza, con dos factores de variación, de evaluaciones cuantitativas del contenido de almidón de tres regiones de un óvulo de albaricoquero. Se realizaron tres repeticiones de cada región en cada una de las tres sesiones de medida. ***, significativo ($p < 0,001$); ns, no significativo; SC, suma de cuadrados; GL, grados de libertad; CM, cuadrados medios.

Fuente de variación	SC	GL	CM	F
Región	$4,94 \times 10^8$	2	$2,47 \times 10^8$	107,56***
Sesión de medida	$8,84 \times 10^5$	2	$4,42 \times 10^5$	0,19 ns
Error	$5,06 \times 10^7$	22	$2,3 \times 10^6$	
TOTAL	$5,46 \times 10^8$	26		

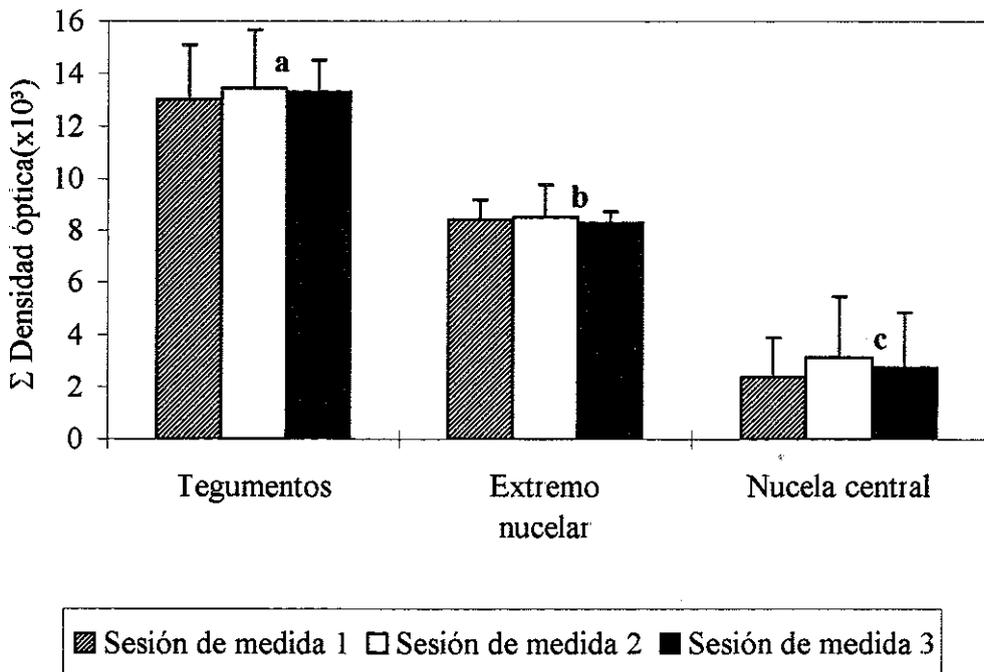


Figura 6.3: Evaluación cuantitativa del contenido de almidón expresado como densidad óptica y medido en tres sesiones independientes. Cada valor representa la media de tres repeticiones. Los valores con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,01$). Las barras verticales indican la desviación estándar.

7. INFLUENCIA DE LAS RESERVAS DEL OVULO
EN EL PROCESO REPRODUCTIVO

7. INFLUENCIA DE LAS RESERVAS DEL OVULO EN EL PROCESO REPRODUCTIVO

7.1. INTRODUCCION

Las flores del género *Prunus* presentan un único carpelo con dos óvulos. Normalmente uno de ellos, el óvulo secundario, degenera, mientras que el otro, el óvulo primario, es fecundado y prosigue su desarrollo, transformándose en semilla (Bradbury, 1929, citado en Harrold, 1935). Sin embargo, en algunos casos ambos óvulos pueden ser viables, produciéndose dos semillas (Roy y Kochba, 1974), mientras que en otras ocasiones los 2 óvulos degeneran (Socias i Company *et al.*, 1976). Este hecho no es exclusivo de *Prunus*, y en gran número de especies con ovarios multiovulares, los óvulos van degenerando hasta que sólo uno de ellos continúa su desarrollo (Uma Shaanker *et al.*, 1988; Charlesworth, 1989a). Lo generalizado de este hecho contrasta con el desconocimiento de las causas que lo provocan. Esta reducción en el número de óvulos puede deberse a factores extrínsecos, como una inadecuada polinización (Burd, 1994) o la falta de recursos para el desarrollo de todos los óvulos fecundados (Marshall y Ellstrand, 1988). Sin embargo, aún en el caso de que haya disponibilidad de polen y de otros recursos externos, existen factores intrínsecos que provocan la reducción de óvulos (Herrero, 1992a; Seavey y Carter, 1996). La degeneración de los óvulos puede ocurrir antes o después de la fecundación (Dahl y Fredrikson, 1996). Los procesos precigóticos que pueden afectar al desarrollo de los óvulos incluyen malformaciones (Eaton y Jamont, 1965; Palser *et al.*, 1990) y deficiencias en la atracción de los tubos polínicos (Herrero, 1992b; Seavey y Carter, 1996). Por otra parte, los primeros óvulos en ser fecundados pueden inhibir la entrada de los tubos polínicos en los otros óvulos (Mogensen, 1975; Mohan Raju *et al.*, 1996) o bien impedir el crecimiento de sus megagametofitos (Sedgley, 1981), provocando en ambos casos que no se produzca la fecundación. Después de la fecundación, el número de óvulos puede regularse mediante el aborto de embriones. Aunque se desconoce el funcionamiento del proceso (Seavey y Carter, 1996), se han apuntado como posibles causas el momento de la fecundación (Mogensen, 1975), la posición del óvulo dentro del ovario (Augspurger, 1986; Wiens *et al.*, 1987), abortos selectivos según el genotipo (Casper y Wiens, 1981) y la producción de inhibidores de crecimiento

por parte de los embriones dominantes (Ganeshaiyah y Uma Shaanker, 1988).

En cerezo (Stösser y Anvari, 1982), almendro (Pimienta y Polito, 1982) y melocotonero (Arbeloa y Herrero, 1985), la degeneración del óvulo se ha asociado con la aparición de callosa. La acumulación de callosa comienza en la zona de la calaza, expandiéndose luego por el tegumento interno hasta ocupar la totalidad de la nucela. Esta deposición comienza antes de que los síntomas morfológicos de degeneración sean apreciables y parece actuar como una barrera que impide la traslocación de metabolitos hacia la nucela, provocando así la interrupción del proceso de crecimiento y posteriormente la degeneración (Pimienta y Polito, 1982). Esta falta de traslocación parece ser el primer eslabón de la cadena en el proceso de degeneración de los óvulos (Arbeloa y Herrero, 1985). La acumulación de callosa se produce en el óvulo secundario antes de la fecundación del óvulo primario (Pimienta y Polito, 1982), por lo que la reducción de óvulos en este género es precigótica.

El almidón presente en las estructuras ovulares también se ha relacionado con la degeneración del óvulo secundario, ya que desaparece paralelamente a la deposición de callosa (Pimienta y Polito, 1982; Arbeloa y Herrero, 1985). Por otro lado, las reservas de almidón presentes en el óvulo primario parecen jugar un importante papel en la nutrición del saco embrionario, disminuyendo su contenido una vez que se produce la fecundación (Arbeloa y Herrero, 1991).

Por lo tanto, la degeneración de los óvulos en *Prunus* viene acompañada por una interrupción de la traslocación en forma de taponamiento de callosa, por una desaparición de las reservas de almidón y por una interrupción del crecimiento. Sin embargo, se desconoce si alguno de estos factores es la causa de la degeneración o si son consecuencia de ella.

Con el objetivo de determinar las implicaciones de las reservas de almidón de los óvulos en el proceso reproductivo así como las causas que provocan la degeneración de óvulos en albaricoquero, se ha seguido la evolución del contenido de almidón, la acumulación de callosa y el crecimiento de cada uno de los dos óvulos desde la antesis hasta después de la fecundación.



7.2 MATERIAL Y METODOS

7.2.1 Preparación del material

Las observaciones se realizaron sobre flores del cultivar Moniquí procedentes de la colección de variedades de la EE Aula Dei en Montañana (Zaragoza) en el año 1993 (Apartado 2.2.1). Para el establecimiento de poblaciones, obtención de polen, emasculación y polinización de las flores, se siguió el procedimiento descrito anteriormente (Apartado 3.2.2).

Se recogieron 30 flores en antesis, y entre 10 y 15 flores por tratamiento y día a partir de entonces durante 9 días y se fijaron los ovarios para su posterior inclusión en parafina. Los pistilos se fijaron en FAA. Una vez incluido el material, se realizaron los cortes para su observación al microscopio, siguiendo los procedimientos descritos anteriormente (Apartado 3.2.4.1 y 3.2.4.2).

Las preparaciones se tiñeron para almidón con I_2KI (Johansen, 1940), con Calcoflúor para celulosa (Hughes y McCully, 1975) y con Azul de anilina para callosa (Linskens y Esser, 1957) (Apartado 3.2.4.3). Todas las preparaciones se observaron en un microscopio Leitz Ortholux II.

7.2.2 Determinación del tamaño de los óvulos

Para la determinación del tamaño de los óvulos se observaron las preparaciones sin teñir en una lupa binocular Wild Heerbrugg M8, (Wild Heerbrugg, Heerbrugg, Suiza). Las imágenes fueron captadas mediante una cámara en color Cohu 8310 RGB conectada al microscopio y procesadas usando un analizador de imagen Quantiment 570 Image Analysis System (Leica Cambridge, Cambridge, Reino Unido). El tamaño de cada óvulo se determinó midiendo la superficie en su máxima sección, considerando, dentro de cada flor, óvulo primario al de mayor tamaño y óvulo secundario al más pequeño. Para ello se elaboró un programa (Apartado 12.2) mediante el cual, a partir de la imagen de la preparación obtenida, se crea una imagen binaria correspondiente únicamente a la sección del óvulo (Fig 7.1). Los resultados se obtienen en formato ASCII por lo que se pueden exportar fácilmente a cualquier hoja de cálculo.

7.2.3. Cuantificación del contenido de almidón del óvulo

Una vez teñidas con I₂KI para almidón, las preparaciones se observaron en el microscopio. Las imágenes fueron captadas y procesadas usando el mismo analizador de imagen. La cuantificación de las variaciones del contenido de almidón del pericarpio se realizó mediante la medida de la densidad óptica de las imágenes obtenidas como se ha descrito en el capítulo 6, considerando la suma de la densidad óptica de cada pixel de la imagen correspondiente al contenido de almidón del campo medido (Apartado 6.2.2). Las medidas se realizaron en las secciones en las que uno de los 2 sacos embrionarios era apreciable y en el corte consecutivo, de forma que se obtuvieron medidas en 2 secciones de cada óvulo. Dentro de cada sección, se midió el contenido de almidón en el extremo micropilar de la nucela y en 2 zonas de los tegumentos (Fig. 7.2.) de 1337 μm^2 cada una, considerando el promedio de las dos medidas de los tegumentos como la estimación del contenido de almidón de los mismos. Posteriormente se hallaron los valores medios de las dos secciones, usando estos valores como los representativos de cada zona del óvulo.

7.2.4. Observación de la callosa en los óvulos

Para la observación de la callosa en los óvulos, se tiñeron los cortes con Azul de anilina al 0,1 % en PO₄K₃ 0,1 N (Currier, 1957), mostrándose de un color amarillo verdoso brillante. Las preparaciones se observaron en un microscopio Ortholux II con fluorescencia de luz incidente para luz violeta con un filtro D (filtro excitador BP 355-425 y filtro bloqueador LP 460) (Apartado 3).

Medida área de óvulos

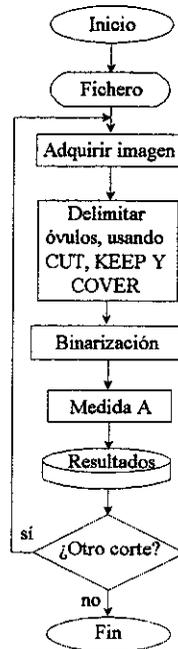


Figura 7.1. Diagrama de flujo del programa utilizado para la medida del tamaño de los óvulos A, área.

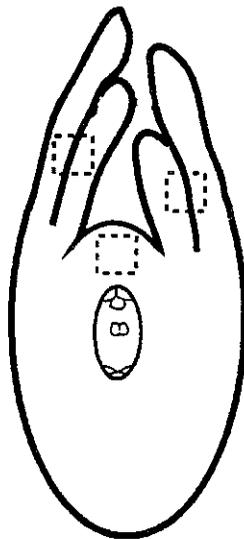


Figura 7.2. Esquema de un óvulo de una flor de albaricoquero. Los recuadros indican las zonas de medida del contenido de almidón.

7.3 RESULTADOS

En antesis, los 2 óvulos de cada flor presentan un tamaño similar. Mientras que uno de ellos, el óvulo primario, continúa creciendo, el otro, el óvulo secundario, detiene su crecimiento (Fig. 7.3a y 7.3b). En antesis, se detecta la presencia de almidón en ambos (Fig. 7.3c). En el óvulo primario en primer lugar disminuye el almidón de la parte interior de la nucela hasta su desaparición, después el del extremo micropilar de la nucela, sin llegar a agotarse, y posteriormente comienza a consumirse el de los tegumentos, coincidiendo con un pronunciado aumento de tamaño. Sin embargo, en el óvulo secundario, todo el almidón desaparece simultáneamente (Fig. 7.3d). Esta pérdida de almidón está asociada a la aparición de callosa en la calaza de este óvulo (Fig. 7.3e), que posteriormente se extiende a toda la nucela, que degenera (Fig. 7.3f).

La evolución del crecimiento del óvulo primario muestra un ligero aumento de tamaño durante los 5 días posteriores a antesis, experimentando a partir de entonces un importante incremento, mientras que el óvulo secundario mantiene el tamaño inicial a lo largo de los 9 días estudiados (Fig. 7.4). La misma dinámica de crecimiento en los 2 óvulos se produce en flores polinizadas (Fig. 7.4a y 7.4b) y en flores no polinizadas (Fig. 7.4c y 7.4d).

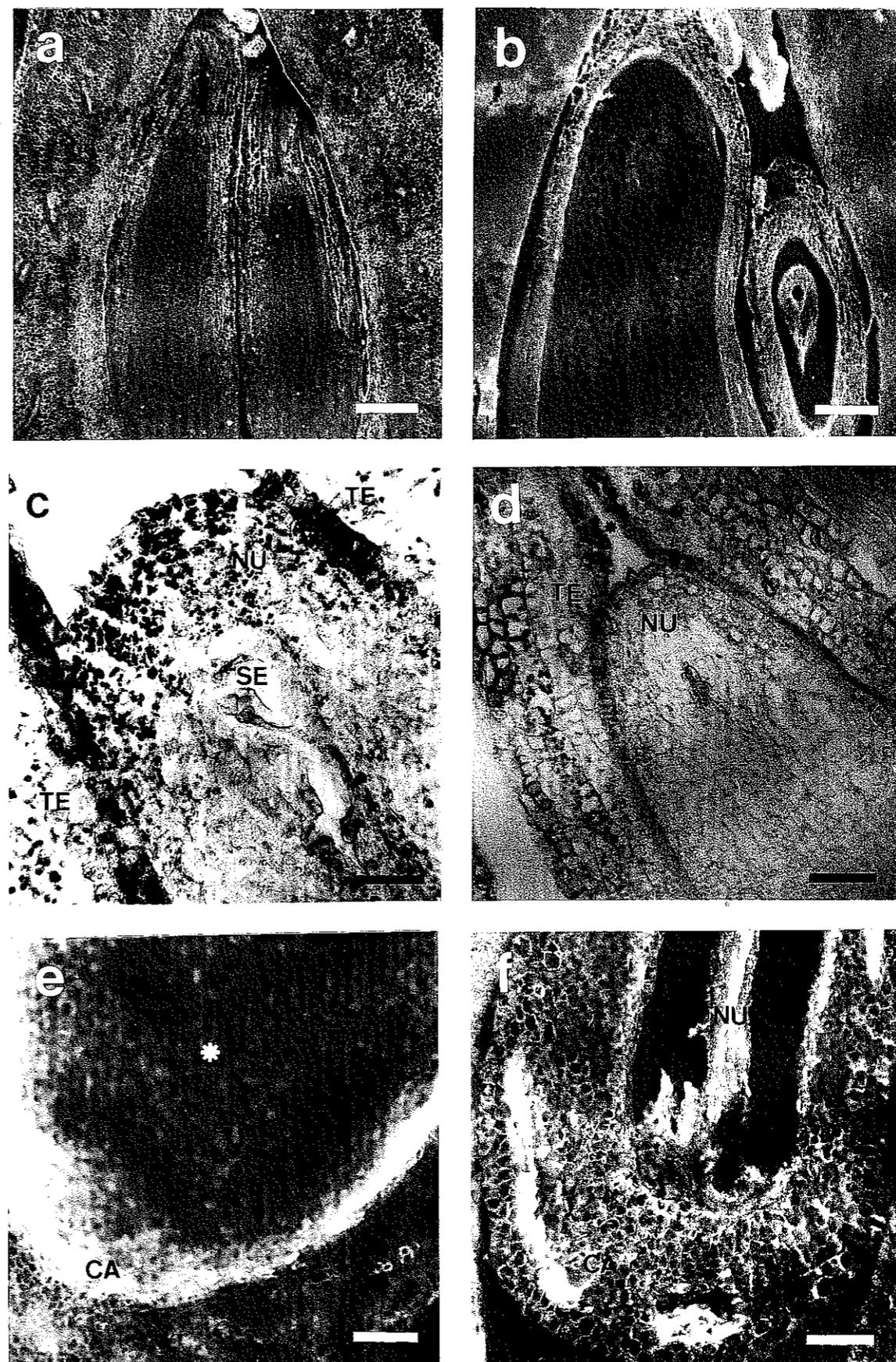
En antesis, se detecta la presencia de almidón en los 2 óvulos, que está distribuido desigualmente por la nucela y por los tegumentos (Fig. 7.3c), y evoluciona de distinta forma según la zona en que se encuentre. El almidón situado en la parte interior de la nucela se va consumiendo durante los primeros 5 días después de antesis en ambos óvulos (Fig. 7.3d). El contenido de almidón del extremo micropilar de la nucela (Fig. 7.5) no experimenta variaciones significativas durante los 3 primeros días, disminuyendo a continuación apreciablemente en los 2 óvulos, quedando en el secundario únicamente restos en el día 5, que desaparecen totalmente en el día 7. La evolución de las variaciones de almidón en el extremo micropilar de la nucela sigue el mismo patrón, con unos contenidos semejantes, en flores polinizadas (Fig. 7.5a y 7.5b) y en flores no polinizadas (Fig. 7.5c y 7.5d). En los tegumentos, se acumula almidón en ambos óvulos desde antesis hasta 3 días después (Fig. 7.6). A partir del tercer día, en el óvulo secundario disminuye rápidamente, primero en el tegumento interno y después en el externo (Fig. 7.3d), hasta su desaparición en el día 7, mientras que en el óvulo primario, tras

estabilizarse unos días, disminuye a partir del día 5 (Fig. 7.6). El contenido de almidón de los tegumentos también evoluciona de la misma manera en flores polinizadas (Fig. 7.6a y 7.6b) y en flores no polinizadas (Fig. 7.6c y 7.6d).

El estudio de la relación entre el crecimiento del óvulo primario y la disminución de su contenido de almidón (Fig. 7.7) indica que estos 2 procesos son inversos y que el rápido crecimiento del óvulo es concomitante con un rápido descenso del contenido de almidón, sin que se aprecie acumulación de callosa. En el óvulo secundario, que mantiene el mismo tamaño desde antesis hasta su degeneración, comienza a acumularse callosa en la calaza a partir del quinto día después de antesis. El almidón desaparece de todas sus estructuras, coincidiendo con la acumulación de callosa (Fig. 7.8). La acumulación de callosa, al igual que la evolución del contenido de almidón, se produce de la misma manera en flores polinizadas y en flores sin polinizar. Por el contrario, en el óvulo primario no se observa callosa salvo excepcionalmente.

Figura 7.3: *Desarrollo y degeneración del óvulo*

- (a) Sección longitudinal del ovario de una flor 5 días después de antesis. El óvulo primario (izquierda) ha aumentado su tamaño mientras que el secundario (derecha) no ha crecido desde antesis. Tinción: Calcoflúor x 53. Barra = 200 μ m.
- (b) Sección longitudinal del ovario de una flor 7 días después de antesis. El óvulo primario (izquierda) ha experimentado un considerable aumento de tamaño mientras que el secundario (derecha) ha degenerado sin experimentar crecimiento desde antesis. Tinción: Calcoflúor x 53. Barra = 200 μ m.
- (c) Sección longitudinal de un óvulo de una flor en antesis, con gran cantidad de almidón distribuido desigualmente por sus estructuras. NU, nucela; SE, saco embrionario; TE, tegumento. Tinción: I₂KI x 560. Barra = 20 μ m.
- (d) Sección longitudinal del óvulo secundario de una flor 5 días después de antesis. El almidón ha desaparecido de la nucela y del tegumento interno. NU, nucela; *, micropilo; IE, tegumento. Tinción: I₂KI x 224. Barra = 50 μ m.
- (e) Sección longitudinal del óvulo secundario de una flor 7 días después de antesis, presentando acumulación de callosa en la calaza. CA, calaza; *, nucela. Tinción: Azul de anilina x 224. Barra = 20 μ m.
- (f) Sección longitudinal del óvulo secundario de una flor 7 días después de antesis, presentando acumulación de callosa en todas sus estructuras, con la nucela degenerada. CA, calaza; NU, nucela. Tinción: Azul de anilina x 224. Barra = 50 μ m.



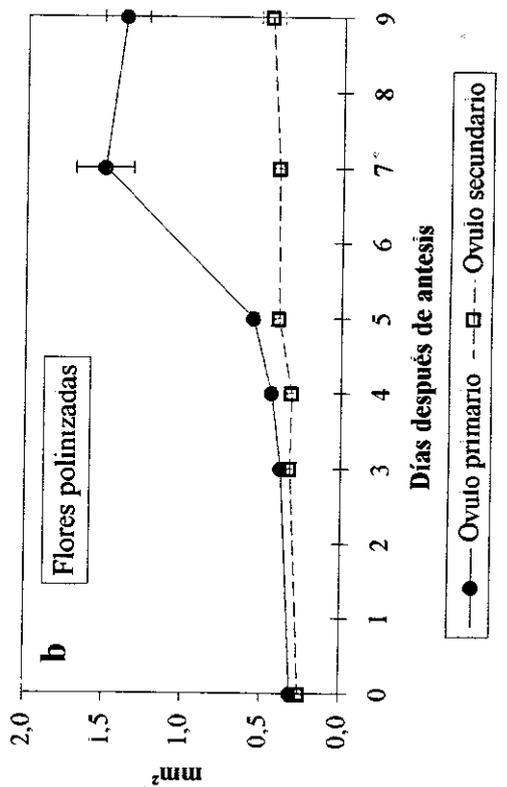
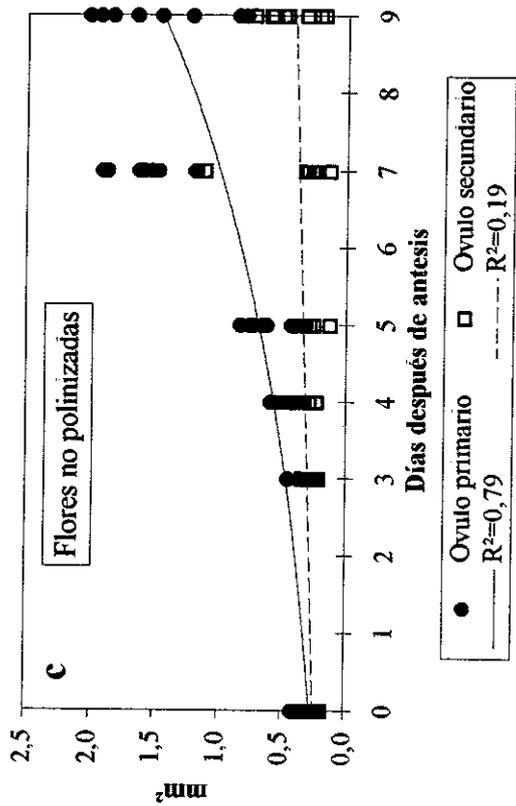
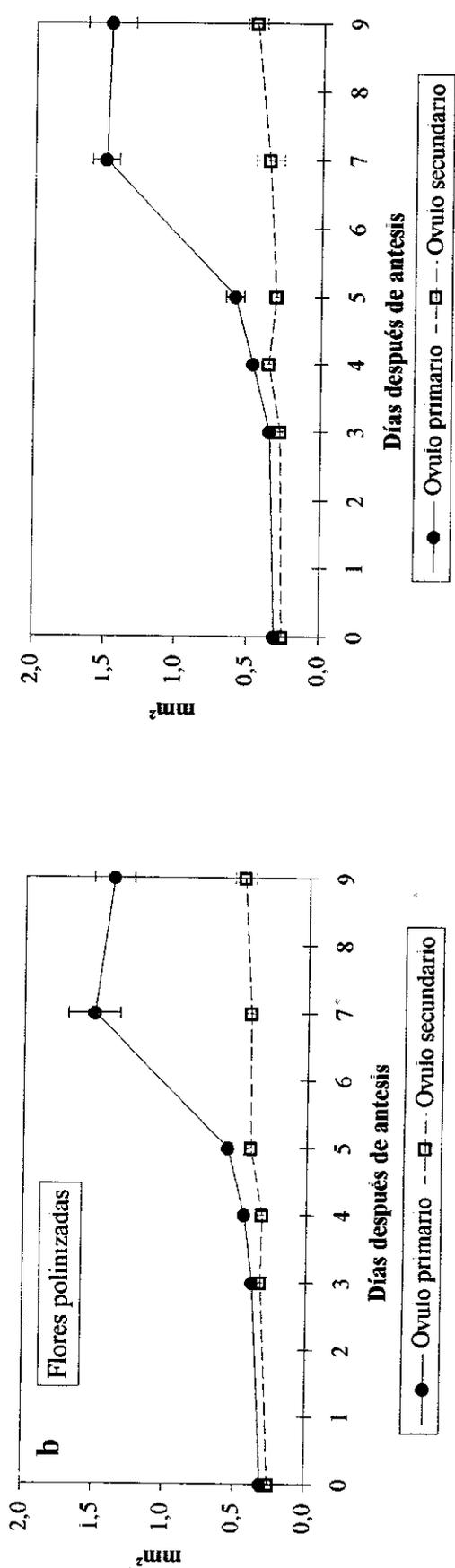
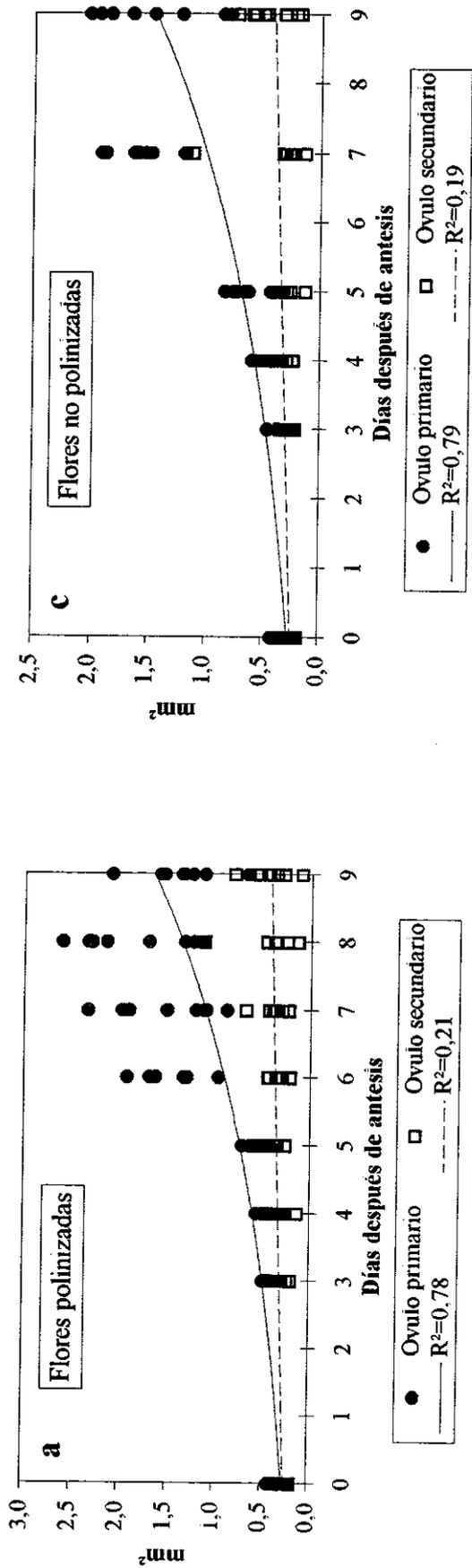


Figura 7.4 : Crecimiento de óvulos en flores polinizadas y no polinizadas de *albaricoquero cv Moniqui*.

Area (mm^2) de la sección máxima del óvulo primario (●) y del óvulo secundario (□) de flores y frutos en el cultivar Moniqui durante los primeros 9 días después de antesis. a) Tendencia según una regresión exponencial (óvulo primario) y una regresión lineal (óvulo secundario) en flores polinizadas. b) Evolución en flores polinizadas (media \pm error estándar). c) Tendencia según una regresión exponencial (óvulo primario) y una regresión lineal (óvulo secundario) en flores no polinizadas. d) Evolución en flores no polinizadas (media \pm error estándar).

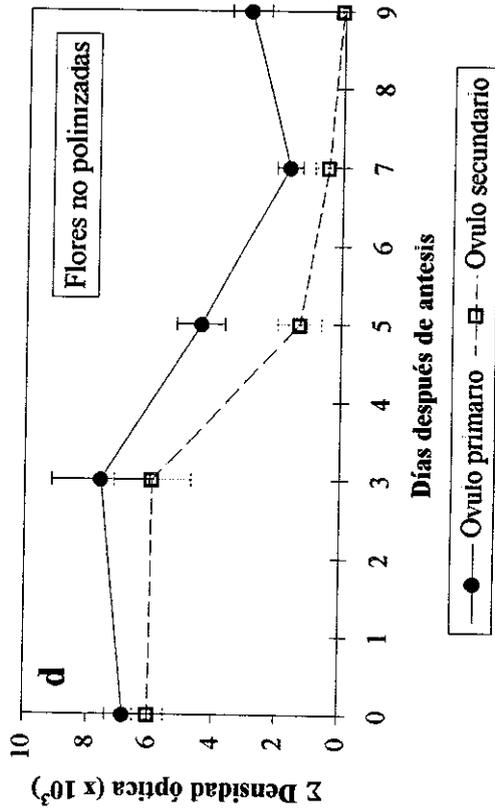
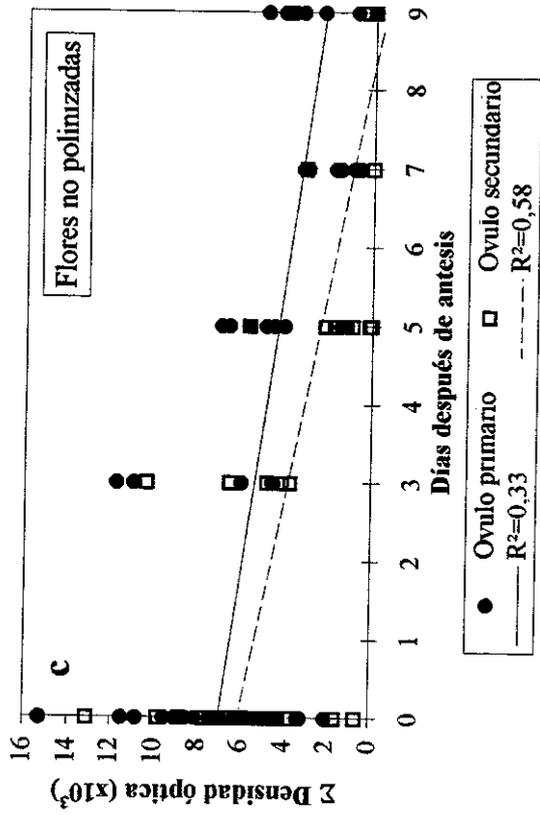
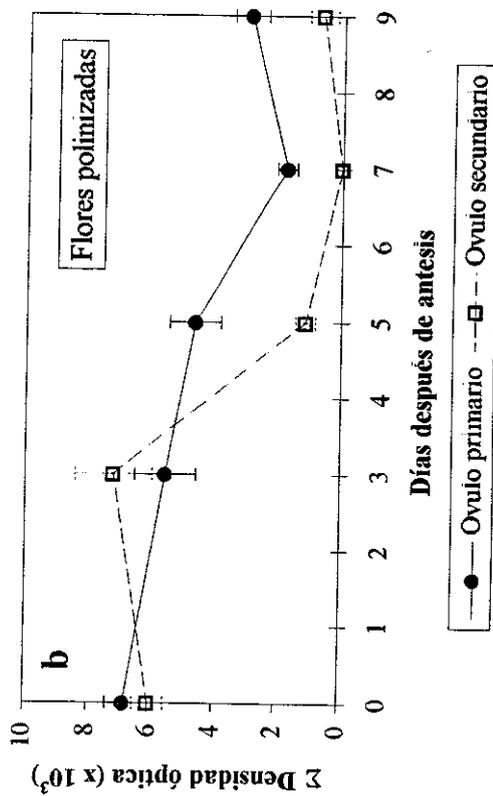
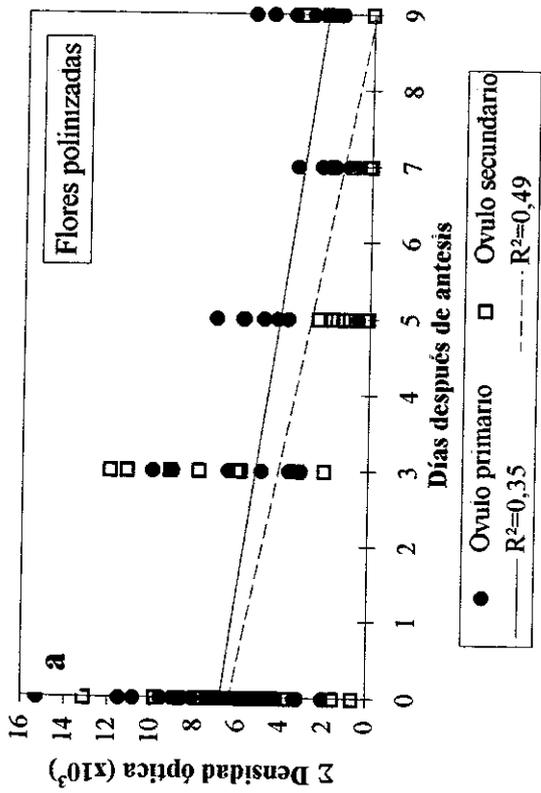


Figura 7.5 : Contenido de almidón en el extremo micropilar de la nucela en flores polinizadas y no polinizadas de *albaricoquero cv Monqui*. Contenido de almidón (Σ Densidad óptica) del extremo micropilar de la nucela del óvulo primario (●) y del óvulo secundario (□) de flores y frutos en el cultivar Monqui durante los primeros 9 días después de antesis. a) Tendencia según regresiones lineales en flores polinizadas. b) Evolución en flores polinizadas (media \pm error estándar). c) Tendencia según regresiones lineales en flores no polinizadas. d) Evolución en flores no polinizadas (media \pm error estándar).

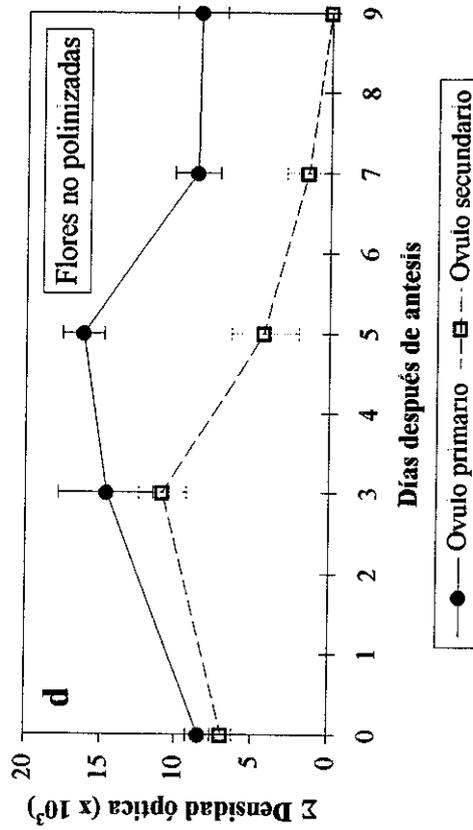
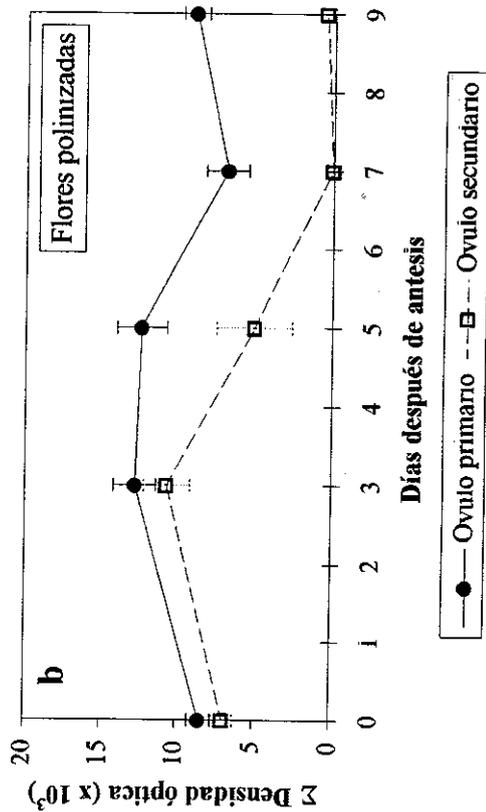
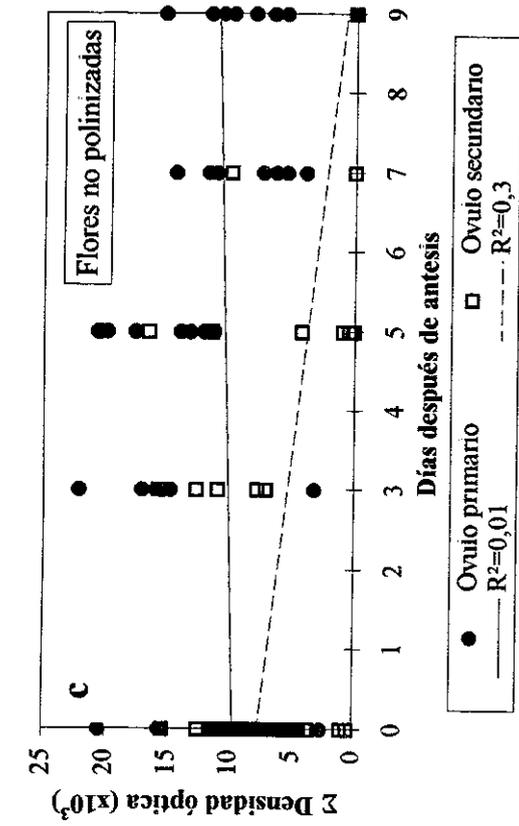
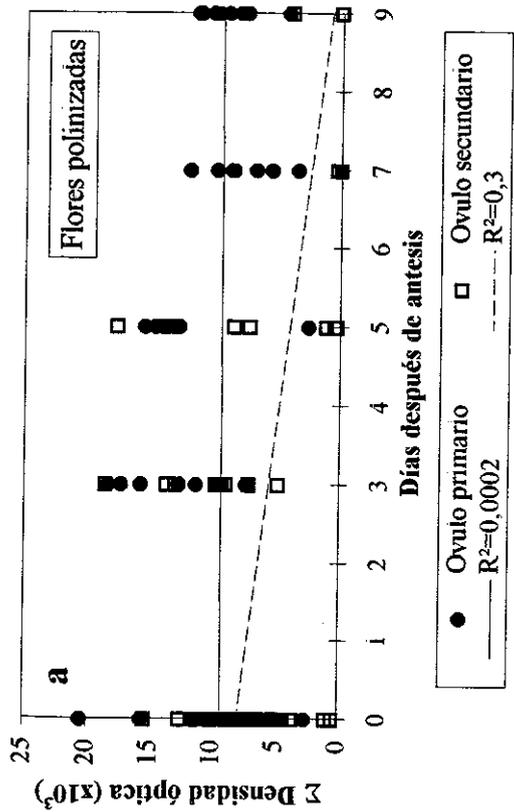


Figura 7.6 : Contenido de almidón en los tegumentos en flores polinizadas y no polinizadas de *albaricoquero cv Moniqui*. Contenido de almidón (Σ Densidad óptica) de los tegumentos del óvulo primario (●) y del óvulo secundario (□) de flores y frutos en el cultivar Moniqui durante los primeros 9 días después de antesis. a) Tendencia según regresiones lineales en flores polinizadas. b) Evolución en flores polinizadas (media \pm error estándar). c) Tendencia según regresiones lineales en flores no polinizadas. d) Evolución en flores no polinizadas (media \pm error estándar).



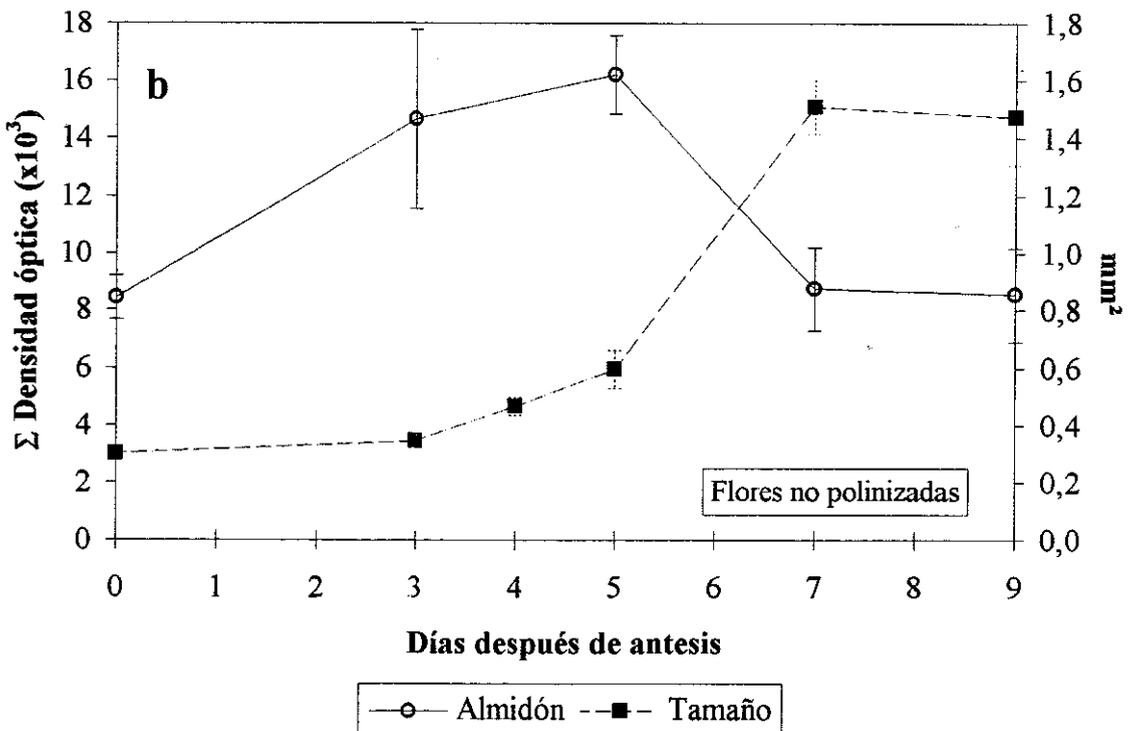
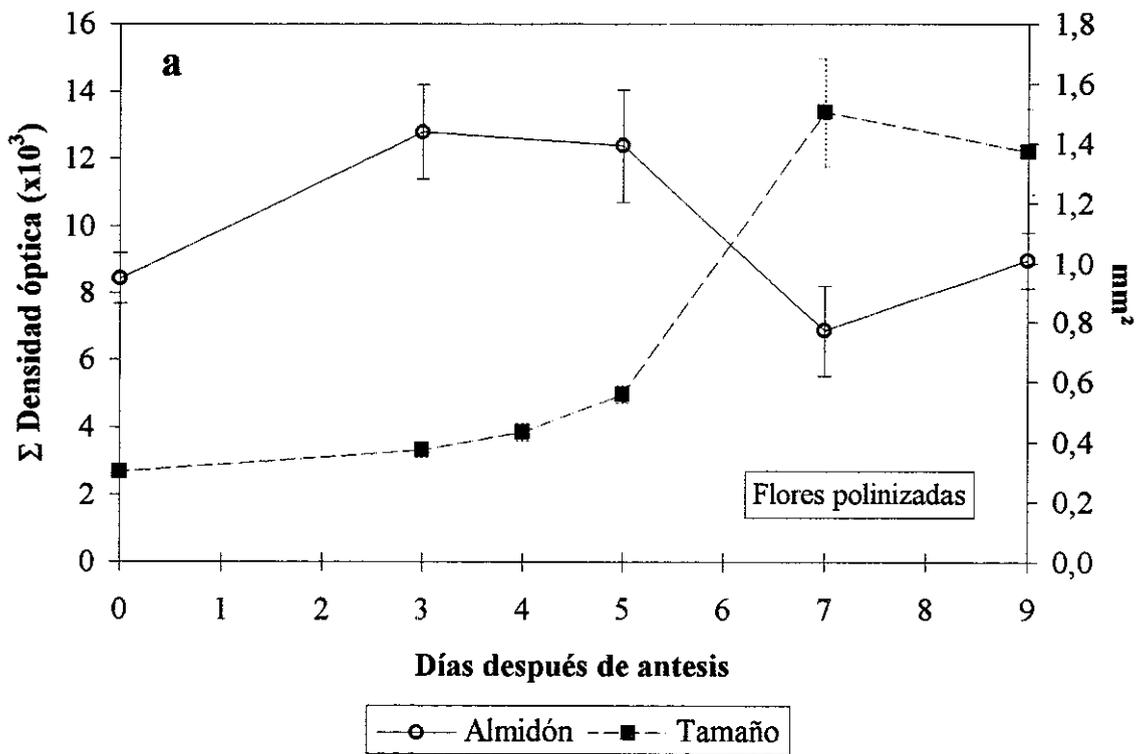


Figura 7.7 : *Contenido de almidón en los tegumentos y crecimiento del óvulo primario en flores polinizadas y no polinizadas de albaricoquero cv Moniquí.*

Contenido de almidón (Σ Densidad óptica) de los tegumentos del óvulo primario (○) (media \pm error estándar) y área (mm^2) de la sección máxima del óvulo primario (■) en flores y frutos del cultivar Moniquí durante los primeros 9 días después de antesis a) Flores polinizadas. b) Flores no polinizadas.

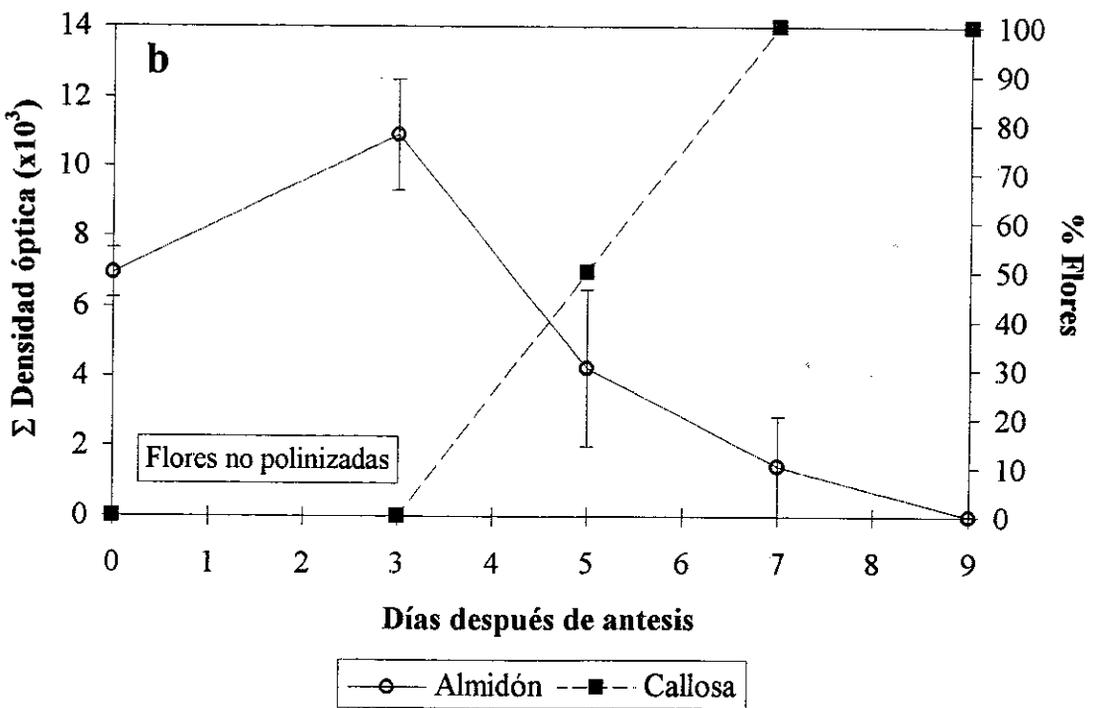
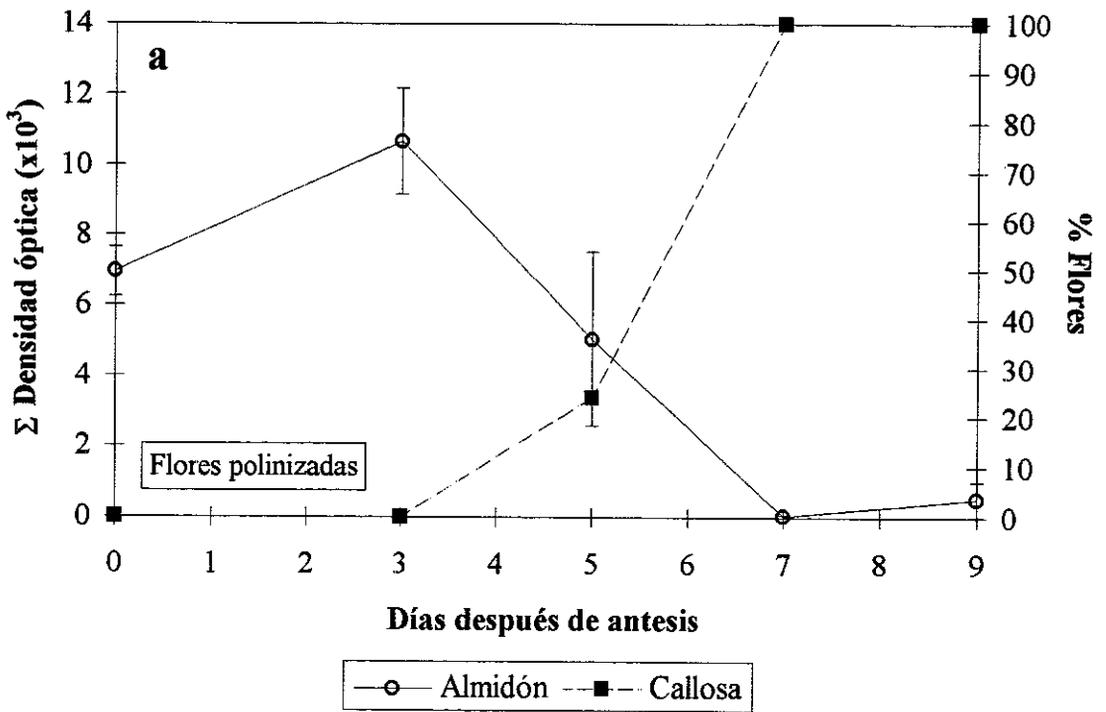


Figura 7.8 : *Contenido de almidón y acumulación de callosa en el óvulo secundario en flores polinizadas y no polinizadas de albaricoquero cv Moniquí. Contenido de almidón (Σ Densidad óptica) de los tegumentos del óvulo secundario (○) (media \pm error estándar) y porcentaje de flores con callosa en la calaza del óvulo secundario (■) en flores y frutos del cultivar Moniquí durante los primeros 9 días después de antesis*

a) Flores polinizadas b) Flores no polinizadas.

7.4. DISCUSION

7.4.1. El almidón como sustento del crecimiento del óvulo primario

El almidón acumulado en el óvulo influye en su desarrollo sustentando el crecimiento en los días posteriores a antesis, como indica la clara relación encontrada entre el crecimiento del óvulo y el consumo de almidón. Este sustento no ocurre de un modo pasivo, sino realizando determinadas funciones en determinados momentos

Estos resultados indican que el almidón se encuentra compartimentalizado, no sólo a nivel general en la estructura de la planta (Watson y Casper, 1984), en las ramas (Sprugel *et al.* 1991) o a nivel inflorescencia (Gutián, 1994), sino también en las distintas estructuras del pistilo. El consumo de almidón no ocurre de manera uniforme en las distintas estructuras ovulares, sino que parece seguir un orden establecido, que indica un posible desarrollo de distintas funciones según el lugar donde esté ubicado. En melocotonero, la disminución del contenido de almidón del óvulo primario se ha relacionado con el desarrollo y elongación del saco embrionario (Arbeloa y Herrero, 1991). Respecto al almidón observado en el interior de los óvulos en antesis, en primer lugar comienza a consumirse el que se encuentra distribuido por la parte central de la nucela, próximo al saco embrionario. En albaricoquero, se ha observado un desarrollo incompleto del saco embrionario en antesis (Eaton y Jamont, 1965; Egea y Burgos, 1994). El almidón de la zona interior de la nucela podría nutrir al saco hasta su maduración. Pocos días más tarde, comienza a disminuir el contenido de almidón del extremo micropilar de la nucela. Al igual que en melocotonero (Arbeloa y Herrero, 1991), estas reservas podrían sustentar la elongación del saco embrionario. Finalmente, el almidón de los tegumentos, cuyo contenido comienza a descender concomitante con la fecundación, podría mantener el desarrollo inicial del embrión y del endospermo, consumiéndose el del tegumento interno con anterioridad al del externo.

7.4.2. El almidón en el proceso de degeneración del óvulo secundario

A finales del siglo pasado (Ward, 1892, citado en Mogensen, 1975), se especuló con la posibilidad de que un óvulo "provocara la muerte por inanición" del resto, acaparando todos los recursos disponibles. Los resultados aquí obtenidos apoyarían esta hipótesis. En el óvulo secundario, que acaba degenerando, se ha observado una evolución de su contenido de almidón similar al del óvulo primario en los 3 primeros días después de antesis. A partir de entonces, cuando las diferencias de tamaño comienzan a ser apreciables entre los óvulos, el almidón de todas las estructuras ovulares va desapareciendo simultáneamente, a diferencia del óvulo primario, donde disminuye progresivamente y de distinta manera según las zonas

El inicio de la disminución del contenido de almidón en los óvulos que degeneran se produce con anterioridad a la acumulación de callosa, que provoca una falta de traslocación de metabolitos hacia la nucela, interrumpiendo así el proceso de crecimiento del óvulo (Pimienta y Polito, 1982), en lo que parece ser el primer eslabón de la cadena en el proceso de degeneración de los óvulos (Arbeloa y Herrero, 1985). La falta de traslocación podría verse influenciada por la variación en la presión osmótica producida tras la disminución del contenido de almidón. La callosa aparecería así como un efecto provocado por la pérdida del almidón. Aunque se desconoce cual es el estímulo que provoca la degeneración de uno de los óvulos, el contenido de almidón, la acumulación de callosa y la ausencia de crecimiento son factores que están ligados en el proceso. Todo ello se produce con anterioridad a la fecundación del otro óvulo, al igual que ocurre en almendro (Pimienta y Polito, 1982). Mientras que el óvulo primario mantiene y regula sus reservas de almidón sin acumular callosa y aumenta de tamaño, el óvulo secundario pierde su almidón, acumula callosa y detiene su crecimiento. La producción de varias semillas por fruto en especies que normalmente presentan una sola (Mogensen, 1975; Roy y Kochba, 1974) podría tener lugar cuando ambos óvulos presentan un estado nutritivo adecuado y en los que no se produce el estímulo que desencadena el proceso de degeneración.

7 4 3. Teorías sobre la reducción del número de óvulos

Los resultados obtenidos han clarificado la secuencia de hechos que se producen tanto en el óvulo primario como en el secundario. Sin embargo, queda por elucidar el desencadenante que provoca estos procesos. Recientemente, se ha sugerido que la degeneración de los óvulos de menor calidad libera unos recursos que pueden ser usados en el desarrollo de los otros (Rigney, 1995). Este aprovechamiento de los recursos se ha interpretado en otras especies como el resultado de una lucha fratricida entre óvulos. Se ha propuesto que, en plantas con ovarios multiovulares en los que se desarrolla una sola semilla, la producción de distintas sustancias químicas por parte del primer óvulo fecundado provocaría la degeneración del resto. Así, en *Quercus* (Mogensen, 1975) y *Macadamia* (Sedgley, 1981) se ha sugerido la existencia de un regulador del crecimiento, producido por el primer óvulo fecundado, que impediría la entrada de los tubos polínicos en la nucela y con ello el desarrollo de otros óvulos. También se han propuesto inhibidores del crecimiento producidos por los embriones dominantes como responsables de la reducción de óvulos en *Dalbergia* (Ganeshaiiah y Uma Shaanker, 1988) y *Kleinhovia*, donde la producción de IAA (ácido 3-indolacético) por parte del primer óvulo fecundado impide el desarrollo de los tubos polínicos en el estilo y con ello la fecundación del resto (Uma Shaanker y Ganeshaiiah, 1989; Mohan Raju *et al.*, 1996). La utilización por parte del óvulo primario de las reservas liberadas por el secundario, podría ser también entendida como una optimización de los recursos disponibles, de la misma forma que existen unas estructuras especializadas en la nutrición de otras, como el endospermo, cuya función es sustentar el crecimiento del embrión, y que parece ser resultado de la evolución de un segundo embrión, cuya degeneración contribuiría al desarrollo del otro, considerándose así como "embrión altruista" (Friedman, 1992, 1994 y 1995).

En albaricoquero, la degeneración del óvulo secundario se produce días antes de la fecundación del óvulo primario, por lo que de existir un factor químico responsable de esa degeneración, no tendría origen embrionario. Este hecho, unido a que el mismo proceso ocurre igualmente en flores no polinizadas, indica que se trata de un fenómeno independiente de la fecundación y de la polinización, y viene determinado por causas intrínsecas a la flor. El estado nutritivo, expresado como el contenido de reservas del óvulo, podría motivar el que éste degenerare o continúe su

desarrollo.

Mientras que la polinización induce la secreción estigmática en melocotonero (Herrero y Arbeloa, 1989; Herrero, 1992a) y afecta al desarrollo del saco embrionario en peral (Herrero y Gascón, 1987), melocotonero (Arbeloa y Herrero, 1991) y albaricoquero (Burgos y Egea, 1993), la dinámica de crecimiento de los 2 óvulos de cada flor, la degeneración del óvulo secundario y la evolución del almidón en las distintas estructuras ovulares, se producen con independencia de la polinización y de la fecundación, y parecen estar predeterminadas por factores intrínsecos a la flor. El almidón del óvulo se presenta como determinante en la nutrición y desarrollo del saco embrionario y del propio óvulo, por lo que jugaría un importante papel en el proceso de desarrollo del óvulo, la fecundación y el desarrollo inicial del embrión.

Una vez determinada la influencia del estado nutritivo del óvulo en la fecundación, el siguiente paso va a ser estudiar las posibles implicaciones del estado nutritivo de la flor en el desarrollo de ésta, en los estados iniciales del fruto y en el cuajado

**8. LAS RESERVAS DE LA FLOR COMO SUSTENTO
DEL DESARROLLO INICIAL DEL FRUTO**

8 LAS RESERVAS DE LA FLOR COMO SUSTENTO DEL DESARROLLO INICIAL DEL FRUTO

8.1 INTRODUCCION

En muchas plantas leñosas, la floración se produce antes que la emisión de hojas (Loescher *et al.*, 1990). En albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.), como en otras especies del género *Prunus*, la antesis y el inicio del desarrollo del fruto tienen lugar en ausencia de hojas o con una mínima superficie foliar (Keller y Loescher, 1989). Por ello, la flor sólo se nutre de las reservas acumuladas por el árbol antes del reposo (Loescher *et al.*, 1990). Cuando las hojas comienzan a producir nuevos fotoasimilados, las flores ya están desarrolladas e incluso se ha establecido el cuajado inicial. La fase de desarrollo comprendida entre el desborre y el cuajado inicial es por lo tanto dependiente de las reservas acumuladas antes del reposo.

Estos estados del proceso reproductivo parecen estar asociados no sólo al rendimiento de la cosecha, sino también a la calidad del fruto (Keller y Loescher, 1989). La división celular del ovario tiene lugar durante el desarrollo de la flor, completándose en 10 días a partir de antesis en guindo (*Prunus cerasus*, L.) (Tukey y Young, 1939) y en 15 días en albaricoquero, guardando relación además con el volumen del mesocarpio (Jackson y Coombe, 1966). Por otro lado, en cerezo (*Prunus avium* L.), se ha encontrado relación entre el color del fruto, la concentración de sólidos solubles y el peso del fruto maduro con el tamaño del ovario en los días siguientes a la antesis (Patten *et al.*, 1986).

La importancia de las reservas es por lo tanto determinante en la vida de las plantas leñosas en general y en el crecimiento de las flores en particular (Oliveira y Priestley, 1988). De la misma forma, la disponibilidad de carbohidratos almacenados es el factor más importante en el proceso de división celular (Jackson y Coombe, 1966), y estas reservas podrían condicionar el proceso reproductivo (Charlesworth, 1989b), así como la calidad y rendimiento de la cosecha (Keller y Loescher, 1989). A pesar de toda esta información indirecta, las implicaciones de las reservas en la iniciación floral, el desarrollo de la flor y el fruto todavía no están bien establecidas (Loescher *et al.*, 1990).

Igualmente, todavía no está claro si los carbohidratos necesarios para el desarrollo de estos procesos son movilizados de otras partes de la planta o si se encuentran presentes en la flor cuando ésta se abre. Las yemas florales de los frutales de hoja caduca de zona templada se forman durante la estación vegetativa, produciéndose parte de la diferenciación floral con anterioridad a la caída de hojas. En cerezo, el período en el que el árbol cubre sus necesidades de frío coincide con la acumulación de almidón en las yemas: no se detecta almidón antes del reposo, pero sí antes del desborre (Felker *et al.*, 1983). Por otro lado, en las yemas de *Rhododendron*, el almidón se acumula antes del reposo, permaneciendo intacto hasta su conversión en azúcares previa a la antesis (Shneider, 1972). Estas reservas podrían jugar un papel clave en el desarrollo de la flor, de la misma forma que los carbohidratos acumulados en el estilo sustentan el crecimiento de los tubos polínicos a lo largo del estilo (Herrero y Dickinson, 1979) y el almidón presente en el ovario influye en el desarrollo de las estructuras ovulares (Arbeloa y Herrero, 1991). Sin embargo, todavía no se conocen todas las implicaciones de las reservas de la flor en el desencadenamiento de la fructificación.

Con el objetivo de conocer las implicaciones del estado nutritivo de la flor en el desarrollo de ésta, en los estados iniciales del fruto y en el cuajado, se ha seguido la evolución del contenido de almidón del pericarpio, desde la antesis a la fecundación, y se ha relacionado con el crecimiento del ovario y de los óvulos, así como con el proceso de división celular en el pericarpio. Con el fin de dilucidar cuales de estos procesos son una respuesta a la fecundación o forman parte de un programa intrínseco de desarrollo, las observaciones se han realizado tanto en flores polinizadas como en flores sin polinizar.

8.2. MATERIAL Y METODOS

8.2.1 Preparación del material

Las observaciones se realizaron sobre las mismas flores del cultivar Moniquí utilizadas en el capítulo 7, procedentes de la colección de variedades de la EE Aula Dei en Montañana (Zaragoza) (Apartado 2.2.1). Para el establecimiento de poblaciones, obtención de polen, emasculación y polinización de las flores, se siguió el procedimiento descrito anteriormente (Apartado 3.2.2).



Se recogieron 30 flores en anthesis, y entre 10 y 15 flores por cada tratamiento y día durante los siguientes 9 días y se fijaron los ovarios para su posterior inclusión en parafina. Para la inclusión en parafina, los pistilos se fijaron en FAA. Una vez incluido el material, se realizaron los cortes para su observación al microscopio, siguiendo los procedimientos descritos anteriormente (Apartados 3.2.4.1 y 3.2.4.2).

8.2.2. Determinación del tamaño del ovario

La cuantificación del tamaño del ovario se realizó pesando de forma individual cada ovario junto a su pedúnculo en una balanza de precisión antes de fijar los ovarios (Apartado 5.2.2.3).

Para poder relacionar el tamaño de cada ovario con la información obtenida de cada flor, también se estimó el tamaño de cada ovario a partir de las secciones del material incluido en parafina. Para ello se observaron las preparaciones sin teñir en una lupa binocular Wild Heerbrugg M8 (Wild Heerbrugg, Heerbrugg, Suiza). Las imágenes fueron captadas y procesadas usando el mismo analizador de imagen. La cuantificación del tamaño del ovario se realizó midiendo el grosor del pericarpio en las mismas secciones en las que se midió el área de los óvulos (Apartado 7.2.3). Se desarrolló un programa (Apartado 12.3) mediante el cual, sobre la imagen captada, se midió la longitud de una línea trazada a lo ancho del pericarpio, estimándose ese valor como el grosor del pericarpio (Fig. 8.1). Los resultados se obtienen en formato ASCII, por lo que se pueden exportar fácilmente a cualquier hoja de cálculo.

8.2.3. Cuantificación del contenido de almidón del pericarpio

Las preparaciones se tiñeron para almidón durante 5 min con I_2KI (Johansen, 1940), y se observaron en un microscopio Leitz Ortholux II. Las imágenes fueron captadas mediante una cámara en color Cohu 8310 RGB conectada al microscopio y procesadas usando un analizador de imagen Quantimet 570 Image Analysis System (Leica Cambridge, Cambridge, Reino Unido). La cuantificación de las variaciones en el contenido de almidón del pericarpio se realizó mediante la medida de la densidad óptica de las imágenes obtenidas como se ha descrito en el capítulo 6, considerando la suma de la densidad óptica de cada pixel de la imagen correspondiente como la estimación del contenido de almidón del campo medido.

(Apartado 6.2.2). Las medidas se realizaron en las secciones en las que uno de los 2 sacos embrionarios era apreciable y en el corte consecutivo, de forma que se obtuvieron medidas en 4 secciones de cada flor. Dentro de cada sección, se midió el contenido de almidón en 4 zonas distintas del pericarpio (Fig 8 2) de $1337 \mu\text{m}^2$ cada una, considerando el promedio de los 16 valores obtenidos para cada flor como la estimación de su contenido de almidón.

8.2.4. Determinación del número de células y del tamaño celular

El número de células del pericarpio y el tamaño medio de las mismas se midieron a lo largo de la anchura del pericarpio. Una vez obtenidos los valores de contenido de almidón, grosor del pericarpio y área de los óvulos, las mismas preparaciones, tras lavarse y secarse, se tiñeron con Calcofluor para celulosa (Hughes y McCully, 1975) (Apartado 3.2.4.3). Las preparaciones se observaron en un microscopio Ortholux II con fluorescencia de luz incidente para luz violeta con un filtro D (filtro excitador BP 355-425 y filtro bloqueador LP 460) y se contó el número de células a lo largo de la anchura del pericarpio. El tamaño medio de las células se obtuvo dividiendo el grosor del pericarpio entre el número de células.

Medida grosor del pericarpio



Figura 8.1. Diagrama de flujo del programa utilizado para la medida del tamaño del pericarpio. L, longitud.

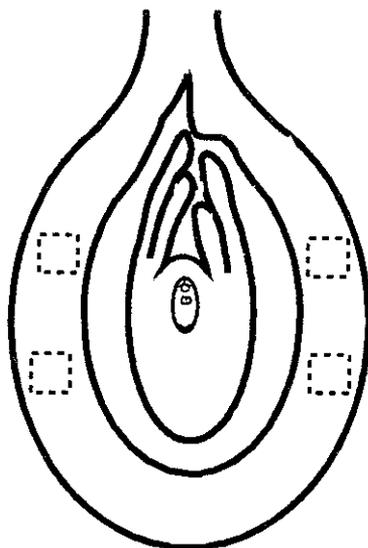


Figura 8.2. Esquema del ovario de una flor de albaricoquero. Los recuadros indican las zonas de medida del contenido de almidón

8.3 RESULTADOS

En el momento de abrirse la flor, el pistilo aparece como un órgano de reserva, con células llenas de almidón en todas sus estructuras. Durante los 9 días estudiados a partir de entonces, la distribución del almidón cambia considerablemente. El contenido de almidón presente en el pericarpio desciende desde su máximo valor en antesis hasta prácticamente su desaparición 9 días más tarde (Fig 8.3). A medida que se consume el almidón, se produce el engrosamiento del ovario (Fig 8.4, datos del capítulo 5), existiendo una correlación negativa entre el contenido de almidón y el grosor del pericarpio (coeficiente de correlación $(R) = -0,59^{***}$). Este engrosamiento se produce paralelamente al aumento del tamaño del óvulo mayor (Fig. 8.5, datos del capítulo 7), con una correlación positiva entre ellos ($R = 0,85^{***}$). Mientras que el tamaño de las células experimenta un ligero aumento durante los 9 días estudiados (de $11,65 \mu\text{m}$ de diámetro en antesis hasta $12,7 \mu\text{m}$ en flores polinizadas y $12 \mu\text{m}$ en no polinizadas), el número de células en el pericarpio aumenta gradualmente desde antesis, siguiendo el mismo patrón que el tamaño del ovario y del óvulo mayor (Fig. 8.6) ($R = 0,82^{***}$ y $R = 0,89^{***}$ respectivamente).

En todos estos procesos se ha registrado una amplia variabilidad entre flores. Con el fin de detectar la causa de esta variabilidad, se ha evaluado el contenido de almidón en el pericarpio en flores aparentemente iguales y sincronizadas de partida. En antesis, los valores siguen una distribución normal, con un valor mínimo de 840 y un máximo de 9154 (Fig. 8.7), con un coeficiente de variación (CV) de 55%, frente al 21% del peso.

La evolución del contenido de almidón (Fig. 8.3), crecimiento del ovario (Fig. 8.4, Apartado 5.3), crecimiento del óvulo mayor (Fig. 8.5) y número de células (Fig. 8.6) siguen un mismo patrón en flores polinizadas y en flores sin polinizar.

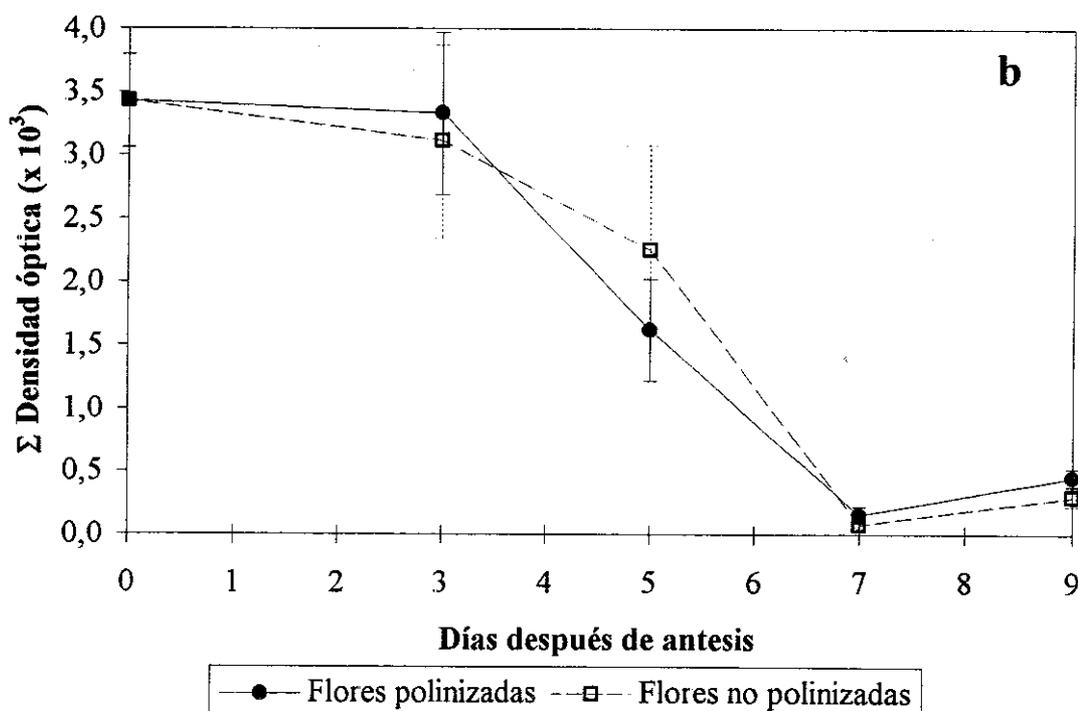
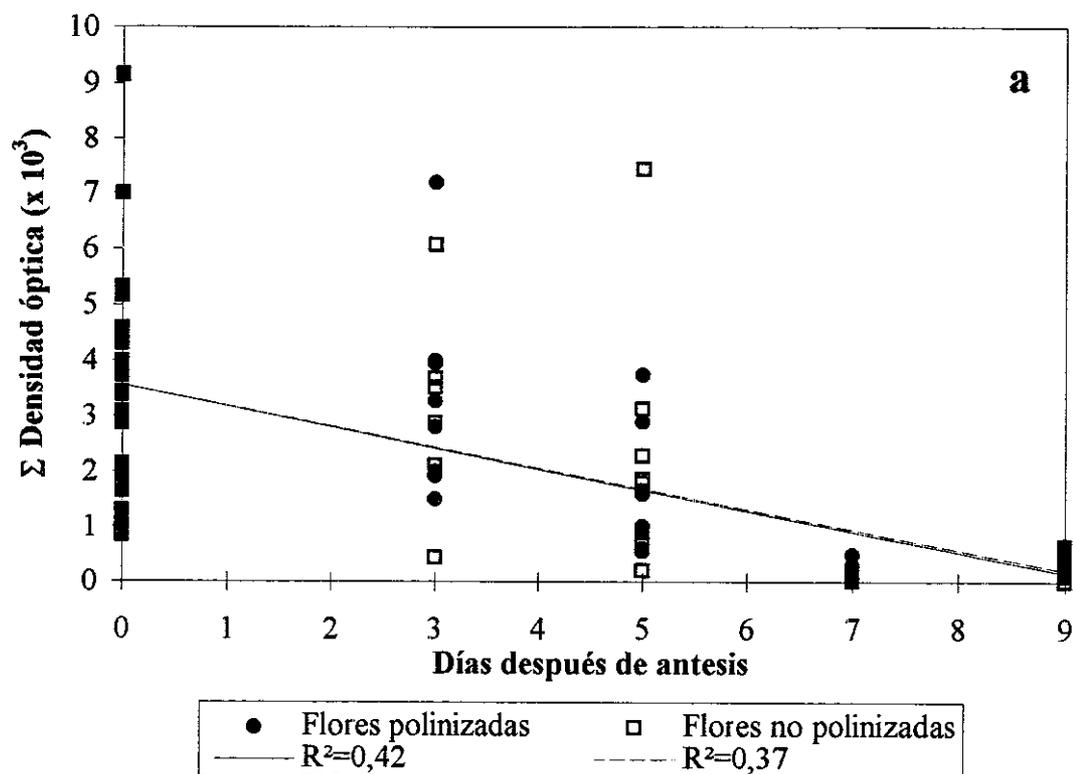


Figura 8.3 : *Contenido de almidón en el pericarpio de flores polinizadas y no polinizadas de albaricoquero cv Moniquí.*

Contenido de almidón del pericarpio (Σ Densidad óptica) de flores y frutos en el cultivar Moniquí durante los primeros 9 días después de antesis en flores polinizadas (●) y no polinizadas(□) en 1993. a) Tendencia de ambas poblaciones según regresiones lineales. b) Evolución en ambas poblaciones (media \pm error estándar).

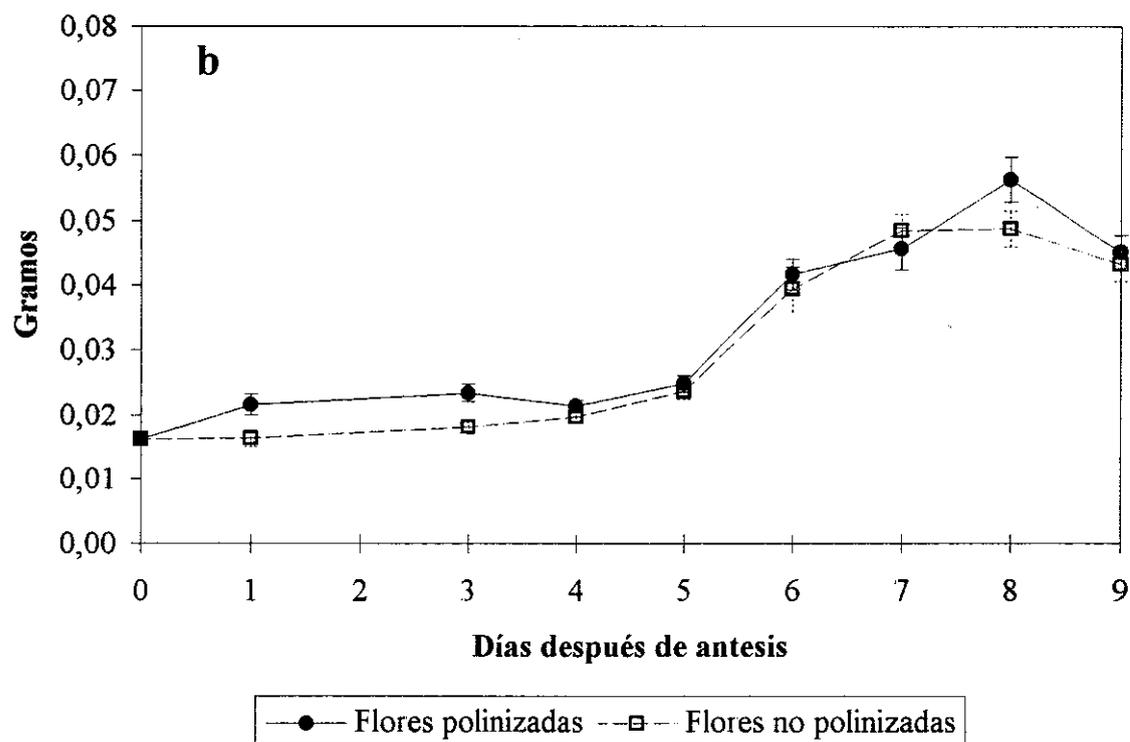
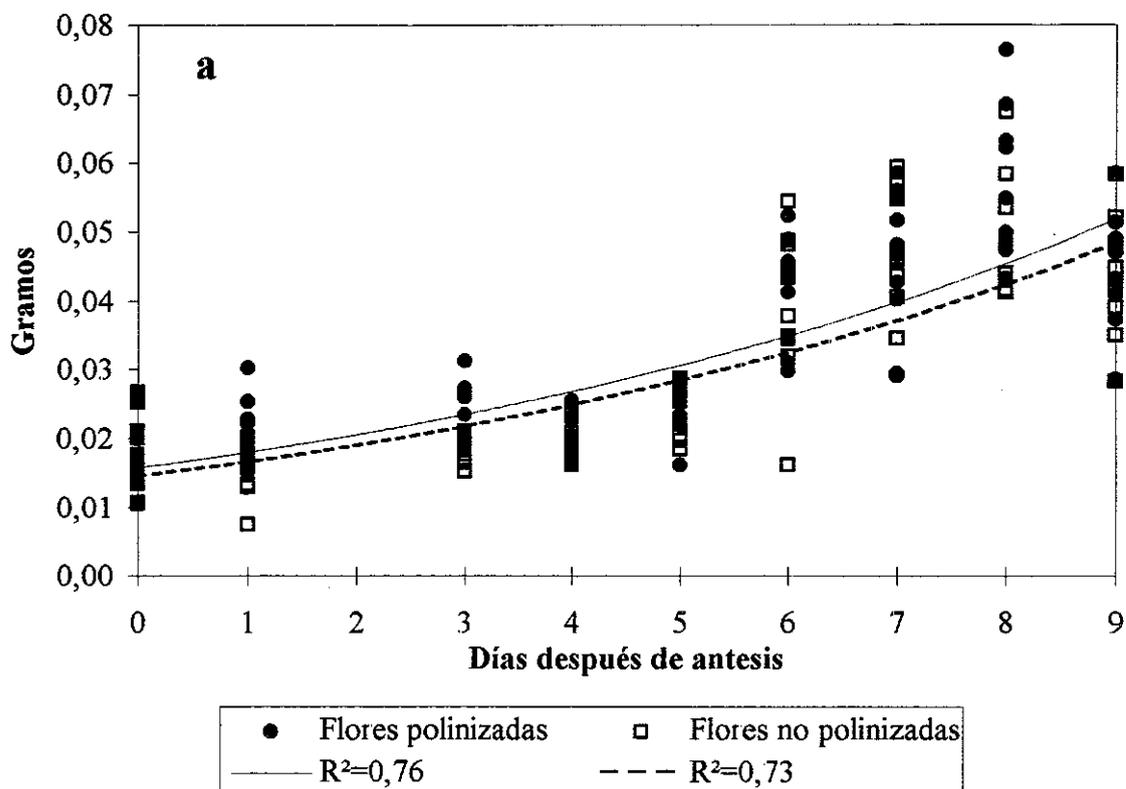


Figura 8.4 : *Peso de flores polinizadas y no polinizadas de albaricoquero cv Moniquí.*
 Peso de flores y frutos (g) en el cultivar Moniquí durante los primeros 9 días después de antesis en flores polinizadas (●) y no polinizadas (□) en 1993.
 a) Tendencia de ambas poblaciones según regresiones exponenciales
 b) Evolución en ambas poblaciones (media ± error estándar)



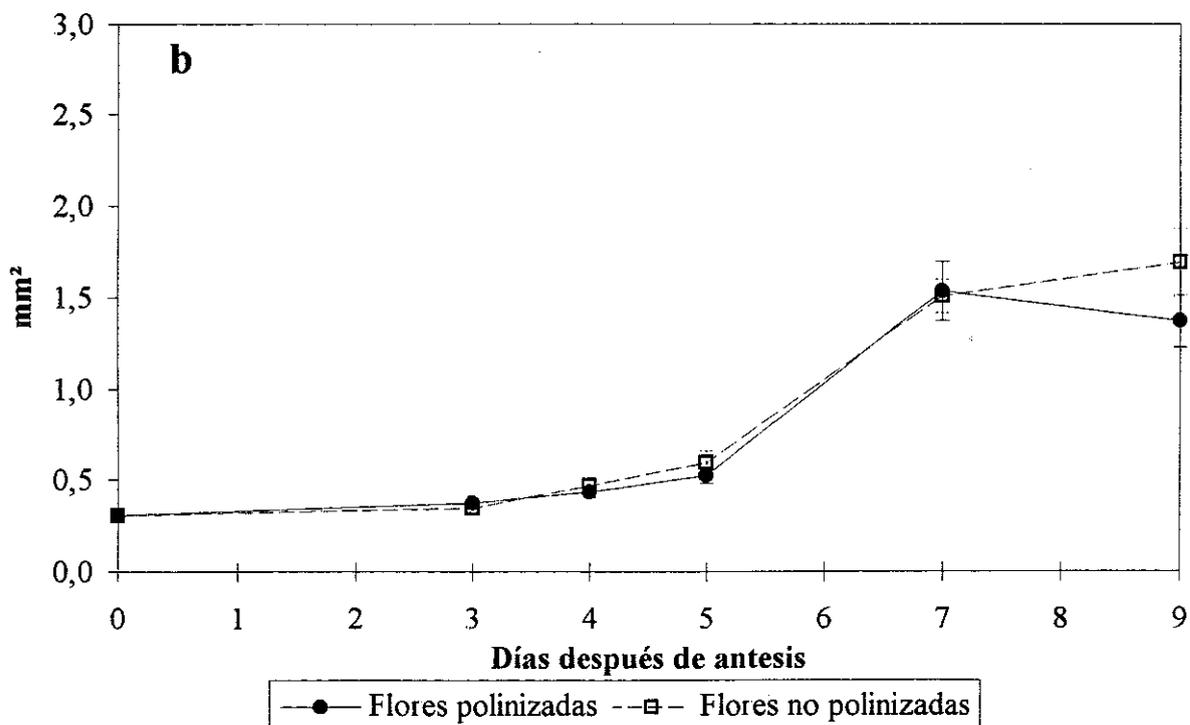
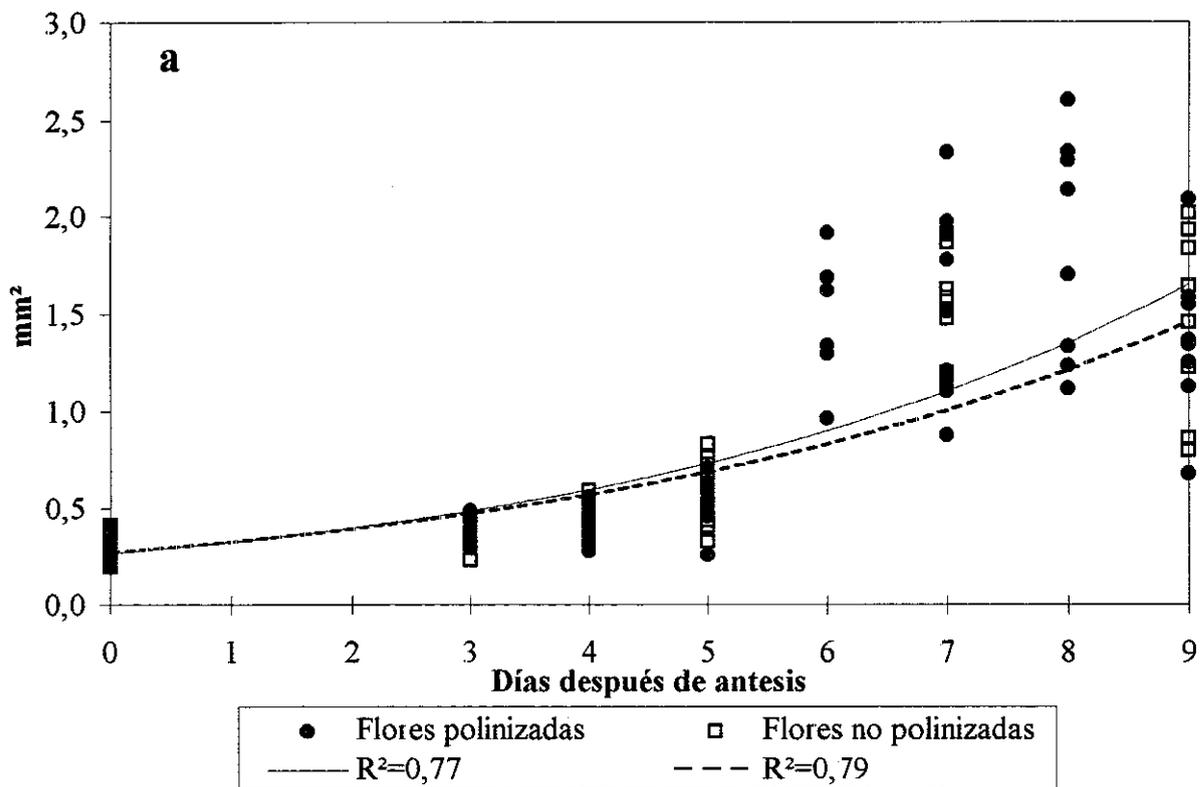


Figura 8.5 : *Tamaño del óvulo primario de flores polinizadas y no polinizadas de albaricoquero cv Moniquí.*

Area de la sección máxima del óvulo mayor de flores y frutos (mm²) en el cultivar Moniquí durante los primeros 9 días después de antesis en flores polinizadas (●) y no polinizadas(□) en 1993 a) Tendencia de ambas poblaciones según regresiones exponenciales Evolución en ambas poblaciones (media ± error estándar).

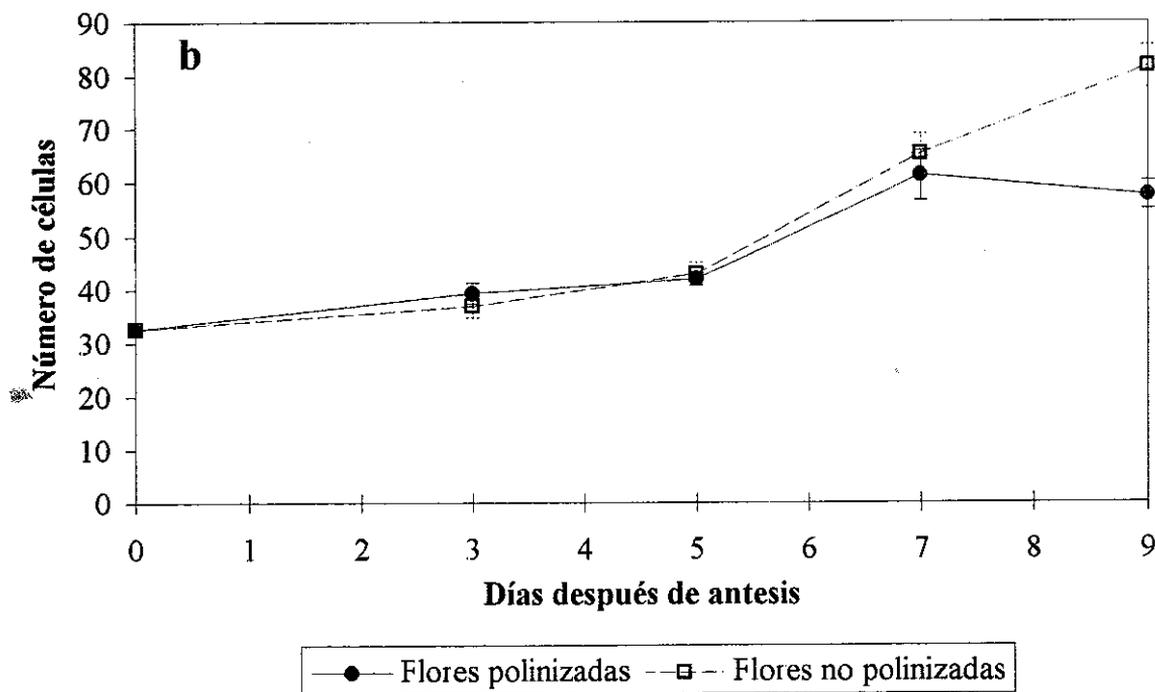
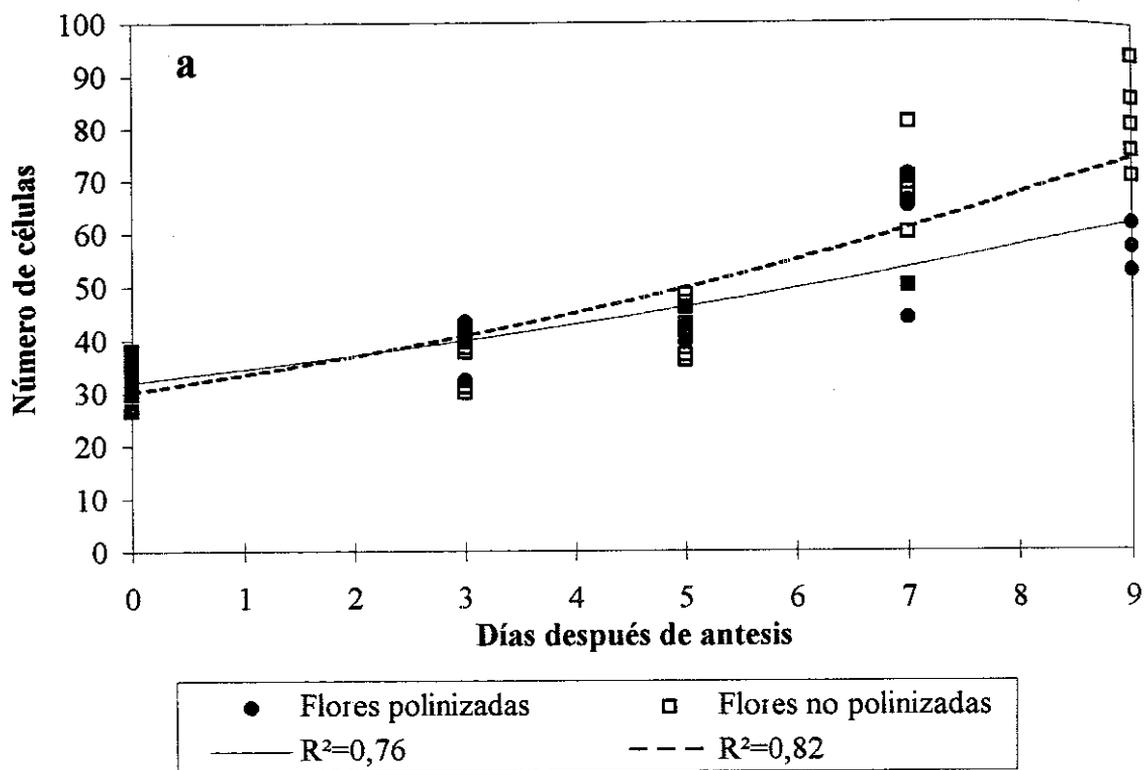


Figura 8.6 : *Número de células en el pericarpio de flores polinizadas y no polinizadas de albaricoquero cv Moniquí*

Número de células a lo largo de la anchura del pericarpio de flores y frutos en el cultivar Moniquí durante los primeros 9 días después de antesis en flores polinizadas (●) y no polinizadas(□) en 1993. a) Tendencia de ambas poblaciones según regresiones exponenciales. b) Evolución en ambas poblaciones (media ± error estándar)

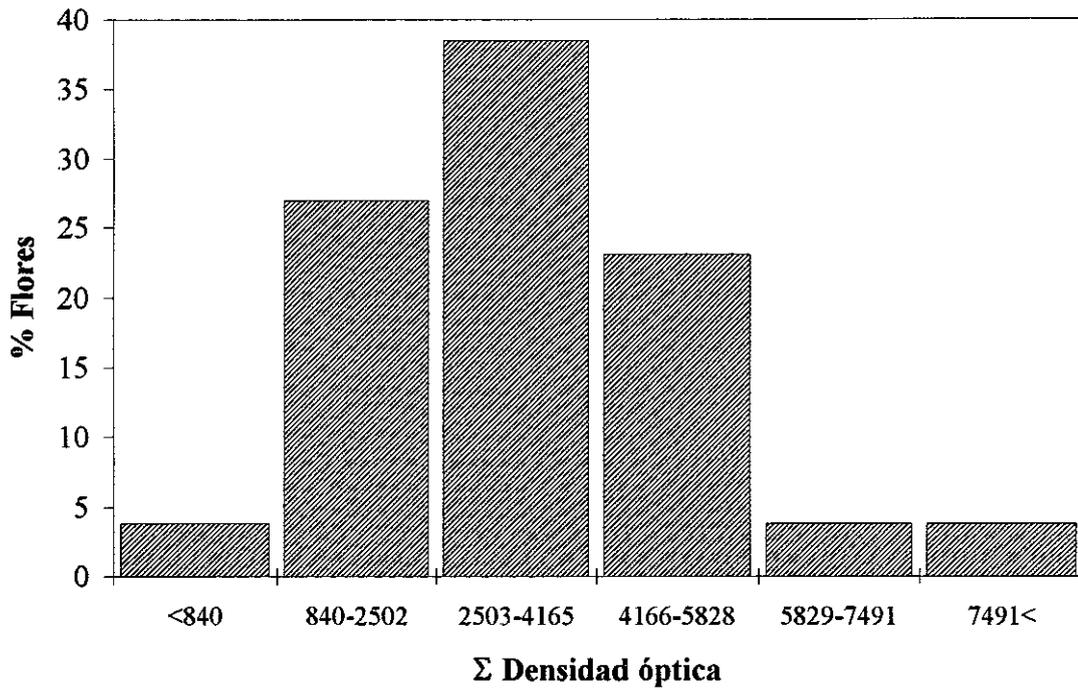


Figura 8.7 : *Distribución de flores en antesis de albaricoquero cv Moniquí en función de su contenido de almidón.*
 Distribución de frecuencias (%) de flores del cultivar Moniquí en antesis en 1993 según su contenido de almidón en el pericarpio (Σ Densidad óptica)

8 4 DISCUSION

El crecimiento y desarrollo de la flor y los estados iniciales del fruto dependen de las reservas acumuladas en la yema floral, ya que el aumento de tamaño sigue un patrón inverso al del consumo del almidón presente en el pericarpio en antesis. Este crecimiento del ovario se debe principalmente a las divisiones celulares, ya que, mientras se registran pocas diferencias en el tamaño de las células, se produce un considerable aumento en su número, por lo que la disminución en el contenido de almidón es también inversa al proceso de división celular: mientras se consumen las reservas en el pericarpio, el número de células aumenta según el mismo patrón que el crecimiento del ovario y del óvulo mayor. Información indirecta obtenida en otras especies sugiere que variaciones en el contenido de carbohidratos en yemas y flores podrían estar implicadas en el desarrollo de las flores: en *Malus*, se ha sugerido una posible relación entre los carbohidratos de la flor y el cuajado (Vemmos, 1995); en *Lilium* se ha asociado el crecimiento de las anteras y el desarrollo del polen con las variaciones en su contenido de almidón (Clement *et al.*, 1994; Clement *et al.*, 1996) y en *Oryza* se ha relacionado la viabilidad del polen con su contenido de carbohidratos (Sheoran y Saini, 1996). Sin embargo, los resultados aquí obtenidos indican de forma directa que en albaricoquero, la división celular y el crecimiento de ovario y óvulos, y por tanto el desarrollo de la flor y las fases iniciales de la fructificación dependen de las reservas de almidón acumuladas en la flor antes de la antesis.

A partir de trabajos morfométricos en manzano, se ha sugerido una cierta autonomía en el crecimiento de las inflorescencias con un número suficiente de hojas durante los estados iniciales de desarrollo de los frutos (Lauri *et al.* 1996). La utilización por parte de las flores de albaricoquero de sus propias reservas para su desarrollo implica un crecimiento autónomo de los frutos en los estados de desarrollo coincidentes con la ausencia de hojas. De este modo, las flores y los frutos en sus estados iniciales se desarrollarían autotróficamente. Cuando el almidón del pericarpio comienza a agotarse, las hojas han alcanzado tamaño suficiente como para ser fotosintéticamente activas, pudiéndose emplear los nuevos fotoasimilados producidos por ellas para el posterior desarrollo del fruto. Durante la fase de crecimiento autótrofo, tiene lugar la fecundación y el inicio del desarrollo del embrión (Capítulo 3). Por otra parte, durante este período, y a expensas del almidón

acumulado en la flor, tiene lugar la mayor parte del proceso de división celular, que en albaricoquero se produce durante 15 días (Jackson y Coombe, 1966) Esto implica que el almidón presente en la flor podría afectar no solo al cuajado sino también a la calidad y al tamaño del fruto Posteriormente, en la fase de crecimiento sustentada por las nuevas hojas, se completaría el desarrollo de la semilla y las células del ovario alcanzarían su tamaño definitivo. El número de células del ovario en los días siguientes a la antesis ha sido relacionado con el tamaño final del fruto (Jackson y Coombe, 1966) De esta forma, las reservas de la flor que sustentan la división celular podrían tener una influencia decisiva en el tamaño final del fruto.

El análisis de los diferentes factores que determinan el cuajado de frutos ha puesto de manifiesto que la principal fuente de variación se debe a algo inherente a la flor (Jackson y Hamer, 1980), que se denominó "calidad de flor", y ha sido definida como la capacidad de una flor o de una yema floral de convertirse en un fruto cuajado (Williams, 1965; Goldwin, 1981). Esta transformación de flor en fruto es la consecuencia de un complicado conjunto de factores relacionados entre sí (Lauri *et al.*, 1996) y la probabilidad de llegar a fruto difiere entre flores (Guitián, 1994). En este sentido se han estudiado como posibles factores relacionados con la calidad de flor tanto caracteres morfológicos de flores e inflorescencias (Lauri *et al.*, 1996) como la posición de la flor en el árbol (Robbie *et al.*, 1993) o en la inflorescencia (Guitián, 1994) De la misma manera, se ha relacionado con diferencias en la capacidad de las flores en cuajar, incluyendo el estado nutritivo (Lloyd, 1980). Sin embargo, las causas fisiológicas que provocan estas diferencias no están determinadas. Los resultados obtenidos muestran que el contenido de almidón del pericarpio en antesis presenta claras diferencias entre flores, y podría estar asociado al *status* nutritivo y a la calidad de flor. La variación encontrada en el peso de las flores en antesis no explica la variación en su contenido de almidón, por lo que flores aparentemente iguales por sus características externas e incluso por su peso presentan marcadas diferencias en su interior. Sin embargo, la gran variabilidad en el contenido de almidón en antesis sí se corresponde con la variabilidad entre pesos en días posteriores (Capítulo 5) Esta idea se complementa con el hecho, también observado en olivo (Cuevas *et al.*, 1995), de que existe una correlación positiva entre el tamaño del ovario y del óvulo primario. Las flores con mejor estado nutritivo podrían ser aquellas que siguen creciendo y completan su desarrollo, mientras que las otras detienen su crecimiento y se desprenden del árbol

(Capítulo 5).

Por otro lado, las flores polinizadas y las no polinizadas siguen el mismo patrón de crecimiento de ovario y óvulos, división celular y contenido de almidón del pericarpio. Por lo tanto, ni el crecimiento inicial ni el *status* nutricional parecen depender de la polinización ni, por lo tanto, de la fecundación, aunque ésta sí es requisito fundamental para el desarrollo posterior del fruto. Este hecho podría explicar la caída de flores fecundadas y la presencia en el árbol de flores sin polinizar durante un considerable período de tiempo (Badr y Crane, 1965; Sedgley, 1980). El cuajado de frutos requeriría la coincidencia de dos factores, los dos necesarios pero no suficientes por separado: la fecundación y un adecuado estado nutritivo de la flor.

Por lo tanto, las flores no usan sus reservas solamente para nutrir el crecimiento de los tubos polínicos a lo largo del estilo (Herrero y Dickinson, 1979) y para el desarrollo de las distintas estructuras ovulares (Arbeloa y Herrero, 1991) y de las anteras (Clement *et al.*, 1996), sino también para su propio desarrollo, así como el del fruto en sus estados iniciales. La importancia de estos estados es decisiva para el éxito del proceso reproductivo, por lo que el papel de las reservas presentes en la flor antes de la emisión de hojas podría ser determinante en el destino final de la flor, con implicaciones en el cuajado y la calidad final del fruto.

9. **DISCUSSION GENERAL**

9. DISCUSION GENERAL

9.1 INFLUENCIA DE LOS DIAS POSTERIORES A ANTESIS EN EL CUAJADO

Los días que siguen a la apertura de la flor juegan un papel decisivo en el establecimiento del cuajado. Por una parte, se desarrolla el proceso reproductivo, y por otra, se desencadena la fructificación. Durante este tiempo intervienen una serie de factores, unos dependientes de la polinización y otros independientes, que forman parte de un programa de desarrollo del pistilo.

Dentro de los factores que guardan relación con la polinización se encuentra la llegada al estigma de polen, el crecimiento de los tubos polínicos a lo largo de las distintas estructuras del pistilo y, finalmente, la fecundación (Capítulo 3). Estos factores afectan especialmente a algunos cultivares de albaricoquero. Aunque esta especie se ha considerado tradicionalmente autocompatible (Bailey y Hough, 1975), en los últimos años se han encontrado numerosos cultivares autoincompatibles (Nyujto *et al.*, 1985; Egea *et al.* 1991; Burgos *et al.* 1993; McLaren y Fraser, 1996). De los 5 cultivares estudiados, 'Moniquí' se comporta como autoincompatible, mientras que 'Bulida', 'Canino', 'Paviot' y 'Royal' lo hacen como autocompatibles. Igualmente, todos los cruzamientos entre cultivares son compatibles. El estudio, en una plantación comercial de 'Moniquí' en la zona productiva más importante de la provincia de Zaragoza, tanto del cuajado como del comportamiento de los tubos polínicos en flores elegidas al azar y flores sobrepolinizadas, muestra que el cuajado en estas condiciones está limitado por la ausencia de polen compatible. 'Bulida', 'Canino' y 'Royal' se podrían utilizar como polinizadoras de 'Moniquí', ya que las épocas de floración son coincidentes, los cruzamientos son compatibles y presentan unas exigencias de frío invernal similares (Capítulo 4).

A pesar de que se realice una buena polinización, se producen una serie de caídas prematuras de flores y frutos, dentro de las cuatro primeras semanas después de antesis, que reducen considerablemente su número inicial. El desencadenamiento de esta caída va precedido de un crecimiento de las flores-frutos, en el que se separan claramente dos poblaciones, unas flores que continúan creciendo y otras que no aumentan de tamaño. Estas dos poblaciones podrían corresponderse con las flores que van a permanecer en el árbol y las que se van a caer, y son ya aparentes a las

dos semanas de la polinización. En estas fases iniciales de desarrollo, tanto los patrones de caída como los de crecimiento ocurren del mismo modo en flores polinizadas y no polinizadas, por lo que son independientes de la fecundación, estando condicionados por factores intrínsecos a la flor (Capítulo 5). El desarrollo aquí observado en flores no polinizadas está relacionado con el engrosamiento del ovario que se ha encontrado en flores no polinizadas de varias especies frutales (Badr y Crane, 1965; Sedgley, 1980; Rapoport y Rallo, 1991a). El análisis del patrón de crecimiento, junto con el desarrollo de la interacción polen-pistilo, que desemboca en la fecundación a partir de 6 días después de la polinización (Capítulo 3), indica que no todas las flores llegan en iguales condiciones a este momento. La fecundación de las flores que han experimentado mayor desarrollo y la caída del resto explicarían la dinámica observada de caída y crecimiento. Las causas que provocan estas diferencias de desarrollo son independientes de la polinización y por lo tanto inherentes a la flor, y explican las diferencias de desarrollo y cuajado encontradas entre flores en manzano (Robbie *et al.*, 1993). Esto se ve refrendado por las observaciones en otras especies, en las que el nivel de cuajado no parece depender únicamente de condiciones externas (Lloyd, 1980; Stephenson, 1992; Guitián *et al.*, 1996), aunque se desconoce cuáles son los factores intrínsecos que lo determinan.

La caída y el cuajado de flores y frutos vienen determinados, por un lado, por la fecundación y, por otro, por factores intrínsecos de la flor, independientes de la polinización. Sin embargo, se desconoce la naturaleza de estos factores intrínsecos. La distribución de recursos se ha apuntado como determinante en el establecimiento del cuajado (Marshall y Watson, 1992; Guitián *et al.*, 1996). Sin embargo, en albaricoquero, al igual que en otros *Prunus*, tanto el desborre (Capítulo 2) como el proceso reproductivo (Capítulo 3) y el inicio de la fructificación (Capítulo 5) se producen en ausencia de hojas (Capítulo 2), por lo que deben de estar sustentados por las reservas acumuladas en el árbol, ya sea en la parte vegetativa o en la misma flor. Este hecho, unido a que la falta de reservas de almidón se ha relacionado con la degeneración de óvulos (Arbeloa y Herrero, 1991), ha llevado a evaluar el papel que las reservas presentes en el interior de la flor pueden jugar en la determinación del cuajado.

9.2. RESERVAS DE LA FLOR, FECUNDACION Y FRUCTIFICACION

La evaluación del papel que desempeña el almidón acumulado en el pistilo tanto en la fecundación como en la fructificación ha sido posible gracias al desarrollo de un nuevo método, mediante la combinación de técnicas histoquímicas con análisis de imagen (Capítulo 6), que ha permitido evaluar el contenido de almidón al microscopio a lo largo de los días posteriores a antesis (Capítulos 7 y 8). El seguimiento del contenido de almidón en distintas estructuras del interior del óvulo ha puesto de manifiesto que el almidón se encuentra compartimentalizado, no sólo a nivel general en la estructura de la planta (Watson y Casper, 1984), en las ramas (Sprugel *et al* 1991) o a nivel inflorescencia (Gutián, 1994), sino también en el interior de la flor. El consumo de almidón no ocurre de manera uniforme en las distintas estructuras ovulares, sino que parece seguir un orden establecido realizando distintas funciones según el lugar donde está ubicado y sustentando el crecimiento del óvulo primario (Arbeloa y Herrero, 1991), por lo que juega un importante papel en la fecundación y en el desarrollo inicial del embrión (Capítulo 7).

El almidón también parece desempeñar un papel decisivo en la degeneración del óvulo secundario. Esta degeneración, al igual que en almendro (Pimienta y Polito, 1982), se produce con anterioridad a la fecundación del óvulo primario, por lo que la existencia de una sustancia química desencadenante del proceso de degeneración no sería producida por el embrión del otro óvulo, como se ha sugerido en otras especies (Mogensen, 1975; Mohan Raju *et al.*, 1996). Este hecho, unido a que el mismo proceso ocurre de forma similar en flores no polinizadas, indica que se trata de un fenómeno independiente de la fecundación e incluso de la polinización, y viene determinado por causas intrínsecas a la flor. Trabajos realizados en melocotonero (Arbeloa y Herrero, 1991) han mostrado que la falta de almidón, la acumulación de callosa y la ausencia de crecimiento son factores que están ligados en el proceso. Mientras que el óvulo primario mantiene y regula sus reservas de almidón sin acumular callosa y aumenta de tamaño, el óvulo secundario pierde su almidón, acumula callosa y detiene su crecimiento (Capítulo 7). Los resultados aquí presentados esclarecen la secuencia de acontecimientos que ocurren en los dos óvulos, y señalan que el primer eslabón es la desaparición de almidón.

Este descenso brusco del contenido de almidón coincide con la acumulación de callosa en la calaza, provocando la detención del crecimiento. Aunque se desconoce cual es el estímulo que desencadena esta rápida desaparición de almidón, parece ocurrir de un modo regulado y siguiendo un patrón diferente de el del óvulo primario, donde disminuye progresivamente y de distinta manera según las zonas. En el óvulo secundario, que acaba degenerando, se ha observado una evolución de su contenido de almidón similar al del óvulo primario en los 3 primeros días después de antesis, en los que prácticamente no hay crecimiento del óvulo ni consumo de almidón. A partir de entonces, cuando las diferencias de tamaño comienzan a apreciarse entre los óvulos, el almidón de todas las estructuras ovulares va desapareciendo masiva y simultáneamente. Así pues, el estado nutritivo, expresado como el contenido de almidón del óvulo, desempeña un papel decisivo, determinando que degenera o continúe su desarrollo y pueda ser fecundado.

Por otro lado, el seguimiento del contenido de almidón del pericarpio ha permitido determinar que el crecimiento y desarrollo de la flor y los estados iniciales del fruto dependen de las reservas acumuladas en la yema floral, ya que, durante los días siguientes a la antesis, el aumento de tamaño del ovario sigue un patrón inverso al del consumo del almidón presente en el pericarpio. El proceso de división celular es también inverso a la disminución del contenido de almidón, y aumenta según el mismo patrón que el crecimiento del ovario y del óvulo primario. Esto implica que, en las fases iniciales de la fructificación, la división celular y el crecimiento de ovario y óvulos, y por tanto el desarrollo de la flor, dependen de las reservas de almidón acumuladas en la flor. Por lo tanto, el crecimiento de las flores y los frutos de albaricoquero, en los estados de desarrollo coincidentes con la ausencia de hojas, se puede considerar autónomo. Puesto que el número de células del mesocarpio en los días siguientes a la antesis ha sido relacionado con el tamaño final del fruto (Jackson y Coombe, 1966), las reservas de la flor que sustentan la división celular podrían tener una influencia decisiva en el tamaño final del fruto (Capítulo 8).

Parece pues claro que el almidón acumulado en el pistilo juega un papel clave, determinando por una parte la fecundación, ya que de los dos óvulos se fecunda el que consigue mantener su almidón, y por otra la fructificación, puesto que el desarrollo inicial del fruto se hace a expensas del almidón acumulado en el pericarpio.

9.3 CALIDAD DE FLOR Y CUAJADO

La calidad de flor se ha definido como la capacidad de una flor de convertirse en fruto cuajado (Williams, 1965; Goldwin, 1981). Es consecuencia de un complicado conjunto de factores (Lauri *et al.*, 1996), y la probabilidad de llegar a fruto difiere entre flores (Guitián, 1994). A pesar de ser un parámetro al que se recurre cuando se producen cuajados erráticos sin una aparente causa climática u otros factores externos que lo expliquen, se desconocen las causas fisiológicas que provocan que entre flores aparentemente iguales unas cuajen y otras no. La sospecha de que, aunque existe una aparente homogeneidad entre flores, debería haber algo inherente a ellas que las distinguiera, se ha confirmado en este trabajo. Los resultados obtenidos muestran que el contenido de almidón de la flor en antesis es drásticamente distinto entre flores (Capítulo 8). Este contenido de almidón marca su *status* nutritivo y determinaría la calidad de flor. La variabilidad encontrada en el contenido de almidón en antesis sí se corresponde con la existente en los pesos en días posteriores (Capítulo 5). Esta idea se complementa con el hecho de que existe una correlación entre el tamaño del ovario y del óvulo primario, pudiendo hablarse de flores con mejor estado nutritivo, que podrían ser aquellas que siguen creciendo y completan su desarrollo, mientras que las otras detienen su crecimiento y se desprenden del árbol (Capítulo 5).

Por otro lado, las flores polinizadas y las no polinizadas siguen el mismo patrón de crecimiento de ovario y óvulos, división celular y contenido de almidón del pericarpio durante los días siguientes a antesis. Por lo tanto, ni el crecimiento inicial ni el *status* nutricional parecen depender de la polinización ni, por lo tanto, de la fecundación, aunque ésta sí es requisito fundamental para el desarrollo posterior del fruto. Este hecho podría explicar la caída de flores fecundadas y la presencia en el árbol de flores sin polinizar durante un considerable período de tiempo (Badr y Crane, 1965; Sedgley, 1980; Capítulo 5). Por lo tanto, el cuajado de frutos requeriría la coincidencia de dos factores, los dos necesarios pero no suficientes por separado: la fecundación y un adecuado estado nutritivo de la flor.

El contenido de reservas de la flor como condicionante del cuajado explicaría las diferencias de calidad encontradas entre flores en manzanos con un aporte nitrogenado suplementario a finales de verano frente a los que únicamente lo

recibieron en primavera. Las denominadas flores "fuertes" presentaron un mayor período efectivo de polinización, motivado por el alargamiento de la receptividad de los estigmas y de la viabilidad de los sacos embrionarios (Williams, 1965) Igualmente, explicaría las variaciones observadas en el cuajado no atribuibles a las temperaturas después de la floración, así como el hecho de que temperaturas elevadas antes de floración redundan en una disminución del cuajado (Jackson y Hamer, 1980), al aumentar la respiración y el consumo del almidón acumulado en la flor antes de que ésta se abra. Por otra parte, explicaría el porqué caracteres posicionales (Robbie *et al.*, 1993) están asociados a la calidad de flor, ya que las mejores flores serían las mejor nutridas.

Las reservas con las que las flores se nutren provienen de las que el árbol acumula antes del reposo (Loescher *et al.*, 1990), ya que, al igual que en muchas otras plantas leñosas, la floración se produce antes que la emisión de hojas (Loescher *et al.*, 1990). En *Prunus cerasus*, durante el reposo, coincidiendo con el período en que se cubren los requerimientos de frío, se sintetiza el almidón que se encuentra presente en las yemas en el momento del desborre (Felker *et al.*, 1983) Por lo tanto, la fase comprendida entre la recolección del fruto y la caída de hojas, en la que el árbol acumula las reservas para la primavera, y el período en el que el árbol cubre sus necesidades de frío (Capítulo 2), influyen en el estado nutritivo de la flor.

Un estudio de los cambios que ocurren desde la diferenciación a la floración permitiría esclarecer los factores que intervienen en el proceso y así determinar las causas por las que las flores en el momento de abrirse presentan distinto contenido de almidón. Sin embargo, los resultados presentados clarifican la secuencia de acontecimientos que desembocan en el cuajado, y el hecho de que la calidad de flor viene determinada por el estado nutritivo de la flor al abrirse, enfatiza la repercusión que tiene en la cosecha el estado nutritivo del árbol el año anterior.



10. **CONCLUSIONES**

10. CONCLUSIONES

1. La flor de albaricoquero entra en reposo preformada, pero el desarrollo del pistilo y, sobre todo, la mayor parte del crecimiento de los óvulos tiene lugar tras el desborre.
2. Los granos de polen germinan a las pocas horas de llegar al estigma, los tubos polínicos comienzan a llegar a la base del estilo tres días después y la fecundación ocurre 6 días después de la polinización.
3. 'Moniquí' se comporta como cultivar autoincompatible. Este hecho parece el principal responsable de los cuajados erráticos observados en este cultivar, siendo necesario el uso de cultivares polinizadores. En las condiciones estudiadas, 'Búlida', 'Canino' y 'Royal', serían unos buenos polinizadores, ya que coinciden sus épocas de floración, los cruzamientos son compatibles y presentan unas exigencias de frío invernal similares.
4. A pesar de que se realice una buena polinización, se produce una caída fisiológica de flores y frutos. El mayor pico de esta caída se produce dentro de las cuatro primeras semanas después de antesis. El hecho de que esta caída ocurra igual en flores polinizadas y en no polinizadas indica que está determinada por factores intrínsecos a la flor, independientes de la polinización.
5. La caída de flores y frutos va precedida de un período de crecimiento de los ovarios, durante el que se establecen claras diferencias de pesos entre ellos. La evolución inicial de los pesos de las flores pone de manifiesto que estas diferencias son ya patentes dos semanas después de antesis, y se observan igualmente en flores polinizadas y en flores sin polinizar, lo que indica que estas diferencias están provocadas por factores inherentes a la flor.

- 6 El método desarrollado mediante la combinación de técnicas histoquímicas y análisis de imagen es un instrumento válido para la evaluación del contenido de almidón al microscopio y permite el seguimiento de los cambios que ocurren en pequeñas estructuras del pistilo
- 7 De los dos óvulos presentes en la flor, normalmente sólo uno de ellos, el óvulo primario, se transforma en semilla. El otro óvulo, el óvulo secundario, degenera en los días siguientes a antesis, antes de que ocurra la fecundación. Esta degeneración va precedida de la pérdida masiva y simultánea de sus reservas de almidón, posteriormente acumula callosa y detiene su crecimiento. La pérdida de almidón es el primer eslabón de esta cadena y es determinante en el proceso de degeneración.
- 8 El óvulo que logra transformarse en semilla, el óvulo primario, se desarrolla en sus fases iniciales a partir de sus propias reservas, siguiendo un proceso de desarrollo independiente de la polinización. El almidón se encuentra compartimentalizado en los distintos tejidos y sigue un patrón de consumo independiente en cada uno de ellos, siendo utilizado en distintas funciones. Este almidón es determinante para que el óvulo llegue en condiciones adecuadas al momento de la fecundación.
- 9 El ovario se desarrolla a partir de las reservas acumuladas en su interior antes de antesis, por lo que su crecimiento en los días posteriores, hasta la salida de hojas, se puede considerar autónomo. El almidón se va consumiendo a medida que el ovario crece, y este crecimiento se debe a una intensa división celular del pericarpio.
- 10 El hecho de que las reservas que presenta el pistilo en antesis jueguen un papel decisivo tanto en la fecundación como en la fructificación, unido a que existen claras diferencias entre flores en cuanto a su contenido de almidón, explica el diferente éxito reproductivo que se produce entre las flores y desvela que el principal determinante de la calidad de flor es su contenido de almidón.

11. **REFERENCIAS**

11 REFERENCIAS

- Abod, S. A. y Webster, A. D. (1991) Carbohydrates and their effects on growth and establishment of *Tilia* and *Betula*. I Seasonal changes in soluble and insoluble carbohydrates. *Journal of Horticultural Science*, 66:235-246.
- Arbeloa, A. (1986). *Estudio de la biología floral y fructificación en melocotonero Prunus persica (L) Batsch*. Tesis doctoral. Universidad de Navarra: Navarra, España
- Arbeloa, A. y Herrero, M. (1985). Valoración de la translocación al óvulo y de la esterilidad femenina en melocotonero. *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei*, 17:214-220
- Arbeloa, A. y Herrero, M. (1987). The significance of the obturator in the control of pollen tube entry into the ovary in peach. *Annals of Botany*, 60:681-686.
- Arbeloa, A. y Herrero, M. (1991) Development of the ovular structures in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *New Phytologist*, 118:527-534.
- Augsburger, C. K. (1986). Double- and single-seeded indehiscent legumes of *Platyidium elegans*: consequences for wind dispersal and seedling growth and survival. *Biotropica*, 18:45-50.
- Badenes, M. L., Asins, M. J., Carbonell, E. A. y Llácer, G. (1996a) Genetic diversity in apricot, *Prunus armeniaca*, aimed at improving resistance to plum pox virus. *Plant Breeding*, 115:133-139.
- Badenes, M. L., Hurtado, M., Martínez-Calvo J. y Llácer, G. (1996b) Mejora varietal del albaricoquero. *Fruticultura profesional*, 82:5-12
- Badr, S. y Crane, J. (1965). Growth of unpollinated ovaries of several deciduous fruit species. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 87:163-167
- Baggiolini, M. (1952). Les stades repérés des arbres fruitiers à noyau. *Revue romande d'Agriculture, Viticulture et d'Arboriculture*, 8
- Bailey, C. H. y Hough, L. F. (1975) Apricots. En: Janick, J. y Moore, J. N. (Editores) *Advances in Fruit Breeding*. Purdue University Press: Lafayette, Indiana, Estados Unidos pp 367-383
- Berlyn, G. P. y Miksche, J. P. (1976) *Botanical Microtechnique and Cytochemistry*. The Iowa State University Press: Ames, Iowa, Estados Unidos
- Bradbury, D. (1929). A comparative study of the developing and aborting fruit of *Prunus cerasus*. *American Journal of Botany*, 16:525-542
- Brewbaker, J. L. (1957). Pollen cytology and incompatibility systems in plants. *Journal of Heredity*, 48:271-277
- Brooks, R. M. (1939) A growth study of the almond fruit. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 37:193-197

- Brown, D. S.** (1952). Relation of irrigation practice to the differentiation and development of apricot flowers buds. *Botanical Gazette*, 114:95-102
- Brown, D. S.** (1953). The effects of irrigation on flower bud development and fruiting in apricot. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 61:119-134.
- Brown, D. S.** (1960) The relation of temperature to the growth of apricot flowers buds. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 75:138-147.
- Brown, D. S. y Abi-Fadel, J. F.** (1953) The stage of development of apricot flower buds in relation to their chilling requirement *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 61:110-118.
- Brown, D. S. y Kotob, F. A.** (1957) Growth of flower buds of apricot, peach, and pear during the rest period. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 69:158-164
- Burd, M.** (1994). Bateman's principle and plant reproduction: the role of pollen limitation in fruit and seed set. *Botanical Review*, 60:83-139
- Burgos, L. y Egea, J.** (1993) Apricot embryo sac development in relation to fruit set *Journal of Horticultural Science*, 68:203-208.
- Burgos, L., Berenguer, T. y Egea, J.** (1993). Self-compatibility and cross-compatibility among apricot cultivars. *Hortscience*, 28:148-150.
- Burgos, L., Berenguer, T. y Egea, J.** (1995). Embryo sac development in pollinated and nonpollinated flowers of two apricot cultivars *Journal of Horticultural Science*, 70:35-39.
- Buyse, J. y Merckx, R.** (1993) An improved colorimetric method to quantify sugar content of plant tissue. *Journal of Experimental Botany*, 44:1627-1629
- Casper, B. B. y Wiens, D.** (1981) Fixed rates of random ovule abortion in *Crytantha flava* (Boraginaceae) and its possible relation to seed dispersal. *Ecology*, 62:866-869
- Clement, C., Chavant, L., Burrus, M. y Audran, J. C.** (1994) Anther starch variations in *Lilium* during pollen development *Sexual Plant Reproduction*, 7:347-356
- Clement, C., Burrus, M. y Audran, J. C.** (1996) Floral organ growth and carbohydrate content during pollen development in *Lilium* *American Journal of Botany*, 83:459-469
- Connors, C. H.** (1920) Growth of fruits of peach. *Reports of the New Jersey Agricultural Experimental Station*, 1919:82-88. °
- Coombe, B. G.** (1976) The development of fleshy fruits *Annual Review of Plant Physiology*, 27:507-528.
- Costa Tura, J. y MacKenzie, K. A. D.** (1990) Ovule and embryo sac development in *Malus pumila*, L. cv Cox's Orange Pippin, from dormancy to blossom. *Annals of Botany*, 66:443-450.

- Crane, J. C. (1964). Growth substances in fruit setting and development *Annual Review of Plant Physiology*, 15:303-326.
- Crane, J. C. (1969) The role of hormones in fruit set and development. *HortScience*, 4:108-111.
- Crane, M. B. y Brown, D. (1937). Incompatibility and sterility in the sweet cherry, *Prunus avium* L. *Journal of Pomology*, 15:86
- Crossa-Raynaud, M. (1961). L'abricot et le climat. En: *Journées Nationales de l'abricotier*. Perpignan. 1961. pp. 55-58.
- Crossa-Raynaud, P. y Audergon, J. M. (1987). Apricot rootstocks. En: Rom, R. C. y Carlson, R. F. (Editores). *Rootstocks for Fruit Crops*. John Wiley & Sons: New York, New York, Estados Unidos pp. 295-320
- Cuevas, J., Rapoport, H. F. y Rallo, L. (1995) Relationships among reproductive processes and fruitlet abscission in 'Arbequina' olive *Advances in Horticultural Science*, 9:92-96.
- Currier, H. B. (1957). Callose substance in plant cells *American Journal of Botany*, 44:478-488
- Chapin, F. S. I., Schulze, E. D. y Mooney, H. A. (1990) The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21:423-447
- Charlesworth, D. (1989a) Why do plants produce so many more ovules than seeds? *Nature*, 338:21-22.
- Charlesworth, D. (1989b) Evolution of low female fertility in plants: pollen limitation, resource allocation and genetic load *Trends in Ecology and Evolution*, 4:289-292.
- Chaumont, M., Morot-Gaudry, J. F. y Foyer, H. (1994) Seasonal and diurnal changes in photosynthesis and carbon partitioning in *Vitis vinifera* leaves in vines with and without fruit. *Journal of Experimental Botany*, 45:1235-1243
- Dahl, A. E. y Fredrikson, M. (1996). The timetable for development of maternal tissues sets the stage for male genomic selection in *Betula pendula* (Betulaceae) *American Journal of Botany*, 83:895-902.
- Dennis, D. T. y Miemyk, J. A. (1982). Compartmentation of nonphotosynthetic carbohydrate metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 33:27-50
- DGA (1987) *Inventario agronómico de frutales Provincia de Zaragoza* Departamento de Agricultura, Ganadería y Montes: Zaragoza, España.
- Dudley, M. E., Jacobs, T. W. y Long, S. R. (1987). Microscopic studies of cell divisions induced in alfalfa roots by *Rhizobium meliloti*. *Planta*, 171:289-301
- East, E. M. y Mangelsdorf, A. J. (1925). A new interpretation of the hereditary behaviour of self sterile plants *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 11:166-183.

- Eaton, G. W. y Jamont, A. M. (1965) Embryo sac development in the apricot, *Prunus armeniaca* L. cv 'Constant'. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 86:95-101
- Egea, J. y Burgos, L. (1994). Year-to-year variation in the developmental stage of the embryo sac at anthesis in flowers of apricot (*Prunus armeniaca* L.) *Journal of Horticultural Science*, 69:315-318.
- Egea, J., García, J. E., Egea, L. y Berenguer, T. (1991) Self incompatibility in apricot cultivars. *Acta Horticulturae*, 293:285-293.
- Erez, A. (1987). Chemical control of budbreak. *HortScience*, 22:1240-1243
- Errea, P. (1991) *Compatibilidad de injerto en albaricoquero (Prunus armeniaca L.) Anatomía y bioquímica de uniones compatibles e incompatibles* Tesis doctoral Universidad de Navarra: Navarra, España
- Errea, P. y Felipe, A. (1992). Compatibilidad de injerto en albaricoquero (*Prunus armeniaca*) *Investigación Agraria Producción y Protección Vegetal*, 8:67-77
- Esau, K. (1987). *Anatomía de las plantas con semilla* Hemisferio Sur: Buenos Aires, Argentina.
- Escudero, V. A. y Rodríguez Navarro, J. (1990). Situación actual del cultivo del albaricoquero *Fruticultura profesional*, 30:43-50
- Espada, J. L. (1989) Situación actual y perspectivas del cultivo del albaricoquero. *Surcos*, 22:5-17.
- EUROSTAT (1996) *Crop production half-yearly statistics*. 2: 62-63
- Fábregas, J. (1981) *El cultivo del albaricoquero* Sintés S.A.: Barcelona, España
- FAO (1995) Anuario de producción 1994 *Colección FAO: estadística*, 125:162-163.
- Feder, N. y O'Brien, T. P. (1968) Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany*, 55:123-142
- Felipe, A. J. (1989) *Patrones para frutales de pepita y hueso*. Ediciones Técnicas Europeas S. A.: Barcelona, España.
- Felipe, A. J. (1990) Patrones para albaricoquero, ciruelo y cerezo *Fruticultura profesional*, 30:3-8
- Felker, F. C., Robitaille, H. A. y Hess, F. D. (1983). Morphological and ultrastructural development and starch accumulation during chilling of sour cherry flower buds *American Journal of Botany* 70:376-386
- Fernández-Escobar, R. y Martín, R. (1987). Chemical treatments for breaking rest in peach in relation to accumulated chilling *Journal of Horticultural Science*, 62:457-461
- Forte, V. (1992). *El albaricoquero*. Mundi-Prensa: Madrid, España
- Free, J. B. (1964). Comparison of the importance of insect and wind pollination of apple trees *Nature*, 201:726-727.

- Friedman, W. E. (1992). Evidence of a pre-angiosperm origin of endosperm: implications for the evolution of flowering plants. *Science*, 255:336-339.
- Friedman, W. E. (1994). The evolution of embryogeny in seed plants and the developmental origin and early history of endosperm. *American Journal of Botany*, 81:1468-1486
- 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 of the United States of America*, 92:3913-3917
- Ganeshiah, K. N. y Uma Shaanker, R. (1988). Seed abortion in wind-dispersed pods of *Dalbergia sissoo*: maternal regulation or sibling rivalry? *Oecologia*, 77 :135-139.
- García, J. E., Egea, J., Egea, L. y Berenguer, T. (1988). The floral biology of certain apricot cultivars in Murcia. *Advances in Horticultural Science*, 2:84-87.
- García-Luis, A., Fomes, F. y Guardiola, J. L. (1995). Leaf carbohydrates and flower formation in *Citrus*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120:222-227.
- Gil-Albert, F. (1989). *Tratado de arboricultura frutal Vol. I Morfología y fisiología del árbol frutal*. Mundi-Prensa: Madrid, España
- Goldwin, G. K. (1981). Hormone-induced setting of Cox apple, *Malus pumila*, as affected by time of application and flower type. *Journal of Horticultural Science*, 56:345-352.
- Goldwin, G. K. (1992). Environmental and internal regulation of fruiting, with particular reference to Cox's Orange Pippin apple. En: Marshall, C y Grace, J (Editores) *Fruit and Seed Production*. University Press: Cambridge, Reino Unido. pp 75-100.
- González, M. V., Coque, M. y Herrero, M. (1994). Pollinator selection in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Journal of Horticultural Science*, 69 :697-702.
- Got, N. (1963). *El albaricoquero*. Mundi-Prensa: Madrid, España.
- Gutián, J. (1994). Selective fruit abortion in *Prunus mahaleb* (Rosaceae). *American Journal of Botany*, 81:1555-1558
- Gutián, J., Gutián, P. y Navarro, L. (1996). Fruit set, fruit reduction, and fruiting strategy in *Cornus sanguinea* (Cornaceae). *American Journal of Botany*, 83:744-48.
- Harrold, T. J. (1935). Comparative study of the developing and aborting fruits of *Prunus persica*. *Botanical Gazette*, 96:585-620.
- Haupt, A. W. (1930). A gelatin fixative for paraffin sections. *Stain Technology*, 5:97-98
- Herrero, J. (1951). Studies of compatible and incompatible graft combinations with special reference to hardy fruit trees. *Journal of Horticultural Science*, 26:186-237
- Herrero, J. y Tabuenca, M. C. (1966). Epocas de floración de variedades de hueso y pepita. *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei*, 8:154-157.

- Herrero, M. (1992a) From pollination to fertilization in fruit trees. *Plant Growth Regulation*, 11:27-32
- Herrero, M. (1992b) Mechanisms in the pistil that regulate gametophyte population in peach (*P. persica*) En: Ottaviano, E., Mulcahy, D L, Sari Gorla, M. y Bergamin Mulcahy, G. (Editores). *Angiosperm Pollen and Ovules*. Springer Verlag: New York, New York, Estados Unidos. pp 377-381.
- Herrero, M. y Arbeloa, A. (1989). Influence of the pistil on pollen tube kinetics in peach (*Prunus persica*) *American Journal of Botany*, 76:1441-1447
- Herrero, M. y Dickinson, H. G. (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. y Dickinson, H. G. (1980). Pollen tube growth following compatible and incompatible intraspecific pollination in *Petunia hybrida*. *Planta*, 148:217-221
- Herrero, M. y Gascón, M. (1987). Prolongation of embryo sac viability in pear (*Pyrus communis*) following pollination or treatment with gibberellic acid *Annals of Botany*, 60:287-294
- Herrero, M. y Homaza, J. I. (1996). Pistil strategies controlling pollen tube growth. *Sexual Plant Reproduction*, 9: en prensa
- Herrero, M. y Salvador, J. (1980) La polinización del ciruelo 'Red Beaut'. *IT EA*, 41:3-7
- Heslop-Harrison, J. (1976) A new look at pollination. *East Malling Research Station Report for 1976*, 141-157
- Heslop-Harrison, Y. (1977) The pollen stigma interaction: pollen tube penetration in *Crocus*. *Annals of Botany*, 41:913-922
- Ho, L. C. (1988) Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39 :355-378
- Homaza, J. I. y Herrero, M. (1994). Gametophytic competition and selection. En: Williams, E G., Knox, R B y Clarke, A E (Editores) *Genetic Control of Self-Incompatibility and Reproductive Development in Flowering Plants*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Holanda pp. 372-400
- Hughes, J. y McCully, M. E. (1975). The use of an optical brightener in the study of plant structure. *Stain Technology*, 50:319
- Jackson, D. I. y Coombe, B. G. (1966) The growth of apricot fruit. *Australian Journal of Agricultural Research*, 17:465-477
- Jackson, J. E. y Hamer, D. J. C. (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.

- Jaumien, F. (1968). The cause of poor bearing trees of the variety 'Doyenne du Comice' *Acta Agrobotanica*, 21:75-106.
- Jefferies, C. J. y Belcher, A. R. (1974) A fluorescent brightener used for pollen tube identification in vivo *Stain Technology*, 49:199-202.
- Jensen, W. A. (1962) *Botanical Histochemistry. Principles and Practice* Freeman, W H and Company: San Francisco, California, Estados Unidos.
- Jensen, W. A. (1973). Fertilization in flowering plants. *Bioscience*, 23:21-51
- Johansen, D. A. (1940). *Plant Microtechnique* McGraw-Hill: New York, New York, Estados Unidos.
- Kandiah, S. (1979). Turnover of carbohydrates in relation to growth in apple trees. II Distribution of ¹⁴C assimilates labelled in autumn, spring and summer. *Annals of Botany*, 44:185-195
- Keller, J. D. y Loescher, W. H. (1989). Nonstructural carbohydrate partitioning in perennial parts of sweet cherry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 114:969-975.
- Kelly, J. D., McNulty, J. A. y Schneider, G. B. (1991) Quantification of tartrate resistant acid phosphatase activity using a computerized image analysis system *Biotechnic & Histochemistry*, 66:228-235
- Kester, D. E. y Griggs, W. H. (1959). Fruit setting in the almond: the pattern of flower and fruit drop *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 214-219.
- Knox, R. B. (1984) The pollen grain. En: Johri, B. M. (Editores). *Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag: Berlin, Alemania. pp 197-261
- Kozłowski, T. T. (1992). Carbohydrate sources and sinks in woody plants *Botanical Review*, 58:107-222.
- Krabel, D. (1992) Influence of source-limitations on fruit development of *Hibiscus rosa-sinensis* L. *Journal of Plant Physiology*, 140:56-60
- Lauri, P. E., Terouanne, E. y Lespinasse, J. M. (1996). Quantitative analysis of relationships between inflorescence size, bearing-axis size and fruit-set. An apple tree case study. *Annals of Botany*, 77:277-286.
- Linskens, H. F. (1986) Recognition during the progamic phase. En: Cresti, M. y Dallai, R. (Editores) *Biology of Reproduction and Cell Motility in Plants and Animals*. University of Siena: Siena, Italia. pp 21-31.
- Linskens, H. F. y Esser, K. (1957). Über eine spezifische Anfärbung der Pollen-schläuche und die Zugl Kallosapopten nach selbstung und fremdung *Naturwiss*, 44:16.
- Loescher, W. H., McCamant, T. y Keller, J. D. (1990) Carbohydrate reserves, translocation, and storage in woody plant roots *HortScience*, 25:274-281

- Luckwill, L. C. (1953) Studies of fruit development in relation to plant hormones. *Journal of Horticultural Science*, 28:14-24.
- Lloyd, D. G. (1980). Sexual strategies in plants: I An hypothesis of serial adjustment of maternal investment during one reproductive session. *New Phytologist*, 86:69-79.
- Maheshwari, P. (1950). *Embriology of Angiosperms*. McGraw-Hill: New York, New York, Estados Unidos
- Malho, R., Read, N. D., Trewavas, A. J. y Pais, M. S. (1995). Calcium channel activity during pollen tube growth and reorientation. *Plant Cell*, 7:1173-1184.
- MAPA (1991) *El sector hortofrutícola español Una panorámica actual* Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Dirección General de la Producción Agraria: Madrid, España.
- MAPA (1995) Anuario de estadística agraria 1993:322-323.
- MAPA (1996) *Boletín mensual de estadística*, 1-2:18
- Marshall, C. y Watson, M. A. (1992) Ecological and physiological aspects of reproductive allocation. En: Marshall, C. y Grace, J (Editores). *Fruit and Seed Production*. University Press: Cambridge, Reino Unido. pp 173-202.
- Marshall, D. L. y Ellstrand, N. C. (1988) Effective mate choice in wild radish: evidence for selective seed abortion and its mechanism. *American Naturalist*, 131:739-756
- Mattson, O., Knox, R. B., Heslop-Harrison, J. y Heslop-Harrison, Y. (1974) Protein pellicle of stigmatic papillae as a probable recognition site in incompatibility reactions *Nature*, 247:298-300
- McLaren, G. F. y Fraser, J. A. (1996). Pollination compatibility of 'Sundrop' apricot and its progeny in the 'Clutha' series. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 24:47-53
- Mehlenbacher, S. A., Cociu, V. y Hough, L. F. (1990). Apricots (*Prunus*). En: Moore, J N y Ballington, J. R. Jr (Editores) *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops* Wageningen, Holanda pp. 63-107.
- Mogensen, H. L. (1975). Ovule abortion in *Quercus* (Fagaceae) *American Journal of Botany*, 62:160-165.
- Mohan Rahu, B., Uma Shaanker, R. y Ganeshaiyah, K. N. (1996). Intra-fruit seed abortion in a wind dispersed tree, *Dalbergia sissoo* Roxb. Proximate mechanisms. *Sexual Plant Reproduction*, 9:273-278.
- Mulcahy, D. L., Mulcahy, G. B. y Ottaviano, E. (1975) Sporophytic expression of gametophytic competition in *Petunia hybrida*. En: Mulcahy, D. L. (Editor). *Gamete Competition in Plants and Animals*. North-Holland Publishing Company: Amsterdam, Holanda. pp. 227-232.
- Myers, D. A., Vogelmann, T. C. y Borman J. F. (1994) Epidermal focussing and effects on light utilization in *Oxalis acetosella* *Physiologia Plantarum*, 91:651-656

- Nettancourt, D. d. (1977) *Incompatibility in Angiosperms*. Springer-Verlag: Berlin, Alemania.
- Nicholas, J. R., Gates, P. J. y Grierson, D. (1986) The use of fluorescence microscopy to monitor root development in micropropagated explants *Journal of Horticultural Science*, 61:417-421.
- Nyutjo, F., Kerek, M. M., Nyeki, J., Toth, M., Pete, A., Harsanyi, H. y Ifju, E. (1985) Introducing foreign apricot cultivars at three different areas of Hungary. Preliminary report *Acta Horticulturae*, 192:353-360
- Oliveira, C. M. y Priestley, C. A. (1988). Carbohydrate reserves in deciduous fruit trees *Horticultural Review*, 10:403-430.
- Outlaw, W. L. y Manchester, J. (1979) Guard cell starch concentration quantitatively related to stomatal aperture *Plant Physiology*, 64:79-82.
- Palser, B. F., Rouse, J. L. y Williams, E. G. (1990) Aberrant ovules and megagametophytes in *Rhododendron nuttallii* (Ericaceae). *Botanical Gazette*, 151:73-87.
- Patten, K. D., Patterson, M. E. y Proebsting, E. L. (1986). Factors accounting for the within-tree variation of fruit quality in sweet cherries *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 111:356-360
- Paunovic, S. A. (1980) Cultivar, rootstocks and environments as potential factors for successful apricot growing. *Acta Horticulturae*, 85:37-52
- Pemadasa, M. A. (1981) Photocontrol of stomatal movements *Biological Review*, 56:551-588
- Pimienta, E. y Polito, V. S. (1982). Ovule abortion in 'Nonpareil' almond [*Prunus dulcis* (Mill) D A. Webb]. *American Journal of Botany*, 69:913-920
- Pimienta, E. y Polito, V. S. (1983). Embryo sac development in almond [*Prunus dulcis* (Mill) D A. Webb] as affected by cross-, self-, and no-pollination *Annals of Botany*, 51:469-479
- Polito, V. S. (1990) *Fruit Morphology* University of Davis: Davis, California, Estados Unidos
- Quinlan, J. D. y Preston, A. P. (1971). The influence of shoot competition on fruit retention and cropping of apple trees *Journal of Horticultural Science*, 46:525-534.
- Raff, J. W., Pettit, J. M. y Knox, R. B. (1981) Cytochemistry of pollen tube growth in stigma and style of *Prunus avium* *Phytomorphology*, 31:214-231.
- Ragland, C. H. (1934) The development of the peach fruit, with special reference to split-pit and gumming *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 31:1-21.
- Rapoport, H. F. y Rallo, L. (1991a). Fruit set and enlargement in fertilized and unfertilized olive ovaries *HortScience*, 26:896-898
- Rapoport, H. F. y Rallo, L. (1991b) Postanthesis flower and fruit abscission in 'Manzanillo' olive *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116:720-723.



- Ray, A., Robinson Beers, K., Ray, S., Baker, S. C., Lang, J. D., Preuss, D., Milligan, S. B. y Gasser, C. S. (1994) Arabidopsis floral homeotic gene BELL (BEL1) controls ovule development through negative regulation of AGAMOUS gene (AG) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91:5761-5765
- Renaudin, J. P., Tournaire, C. y Teysseidier de la Serve, B. (1991) Quantitative analysis of protein changes during meristem initiation and bud development in protoplast-derived *Petunia hybrida* callus. *Physiologia Plantarum*, 82:48-56.
- Rigney, L. P. (1995) Postfertilization causes of differential success of pollen donors in *Erythronium grandiflorum* (Liliaceae): nonrandom ovule abortion *American Journal of Botany*, 82:578-584
- Robbie, F. A. y Atkinson, C. J. (1994) Wood and tree age as factors influencing the ability of apple flowers to set fruit *Journal of Horticultural Science*, 69:609-623
- Robbie, F. A., Atkinson, C. J., Knight, J. N. y Moore, K. G. (1993) Branch orientation as a factor determining fruit set in apple trees. *Journal of Horticultural Science*, 68:317-335.
- Roper, T. R., Keller, J. D., Loescher, W. H. y Rom, C. R. (1988) Photosynthesis and carbohydrate partitioning in sweet cherry: fruiting effects. *Physiologia Plantarum*, 72:42-47.
- Roy, S. P. y Kochba, J. (1974) The inheritance of bitter and double kernel characters in the almond (*Prunus amygdalus* Batsch). *Zeitschrift fur Pflanzenzuchtung*, 71:319-329.
- Sabatini, D. D., Bench, K. y Barnett, R. J. (1963) Cytochemistry and electron microscopy The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation *Journal of Cell Biology*, 17:19-58
- Sanz, A., Monerri, C., González-Ferrer, J. y Guardiola, J. L. (1987) Changes in carbohydrates and mineral elements in *Citrus* leaves during flowering and fruit set *Physiologia Plantarum*, 69:93-98.
- Saure, M. C. (1985) Dormancy release in deciduous fruit trees *Horticultural Reviews*, 7:239-299.
- Schneider, E. F. (1972) The rest period of Rhododendron flower buds. III. Cytological studies on the accumulation and breakdown of protein bodies and amyloplasts during flower development *Journal of Experimental Botany*, 23:1021-1038
- Schroeder, C. A. (1953) Growth and development of the Fuerte avocado fruit *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 61:103-109
- Schultz, J. H. (1948) Self-incompatibility in apricots *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 51:171-174
- Schulz, S. R. y Jensen, W. A. (1968) *Capsella* embryogenesis: The synergids before and after fertilization. *American Journal of Botany*, 55:541-552.
- Seavey, S. R. y Carter, S. K. (1996) Ovule fates in *Epilobium obcordatum* (Onagraceae). *American Journal of Botany*, 83:316-325

- Sedgley, M. (1980) Anatomical investigation of abscised avocado flowers and fruitlets. *Annals of Botany*, 46:771-777.
- Sedgley, M. (1981) Early development of the *Macadamia* ovary. *Australian Journal of Botany*, 29:185-193.
- Sedgley, M. y Buttrose, M. S. (1978) Structure of the stigma and style of the avocado. *Australian Journal of Botany*, 26:663-682.
- Sedgley, M. y Griffin, A. R. (1989). *Sexual Reproduction of Tree Crops* Academic Press: London, Reino Unido
- Sedgley, M. y Scholefield, B. P. (1980) Stigma secretion in the water melon before and after pollination. *Botanical Gazette*, 141:428-434
- Sheoran, I. S. y Saini, H. S. (1996). Drought-induced male sterility in rice: changes in carbohydrate levels and enzyme activities associated with the inhibition of starch accumulation in pollen. *Sexual Plant Reproduction*, 9:161-169
- Shivanna, K. R. (1982). Pollen-pistil interaction and control of fertilization. En: Johri, B. M. (Editores) *Experimental Embriology of Vascular Plants* Springer-Verlag: Berlin, Alemania. pp 131-174.
- Smith, A. M., Denyer, K. y Martin, C. R. (1995) What controls the amount and structure of starch in storage organs? *Plant Physiology*, 107:673-677.
- Smith, G. S., Clark, C. J. y Boldingh, H. L. (1992). Seasonal accumulation of starch by components of the kiwifruit vine. *Annals of Botany*, 70:19-25.
- Snow, A. A. y Spira, T. P. (1991) Pollen vigour and the potential for sexual selection in plants. *Nature*, 352:796-797.
- Socias i Company, R., Kester, D. E. y Bradley, M. V. (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
- Sprugel, D. G., Hinckley, T. M. y Schaap, W. (1991). The theory and practice of branch autonomy. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22:309-334.
- Stephenson, A. G. (1981) Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 12:253-279.
- Stephenson, A. G. (1992) The regulation of maternal investment in plants. En: Marshall, C. y Grace, J. (Editores). *Fruit and Seed Production* University Press: Cambridge, Reino Unido. pp 151-171.
- Sterling, C. (1964). Comparative morphology of the carpel in the Rosaceae I Prunoidae: *Prunus*. *American Journal of Botany*, 51:36-44.
- Stem, R. A., Eisenstein, D., Voet, H. y Gazit, S. (1996) Anatomical structure of two day old litchi ovules in relation to fruit set and yield. *Journal of Horticultural Science*, 71:661-671.

- Stösser, R. y Anvari, S. F. (1982) On the senescence of ovules in cherries. *Scientia Horticulturae*, 16:29-38
- Tabuenca, M. C. (1967). Necesidades de frío invernal de variedades de albaricoquero *Anales de Aula Dei*, 8:10-24
- Tilton, V. R. y Homer, M. T. Jr. (1980). Stigma, style, and obturator of *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) and their function in the reproductive process. *American Journal of Botany*, 67:1113-1131.
- Tilton, V. R. y Lersten, N. R. (1981). Ovule development in *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) with a review of selected papers on angiosperm reproduction III Nucellus and megagametophyte *New Phytologist*, 88:477-504.
- Tilton, V. R., Wilcox, L. W., Palmer, R. G. y Albertsen, M. C. (1984). Stigma, style, and obturator of soybean, *Glycine max* (L) Merr (Leguminosae) and their function in the reproductive process. *American Journal of Botany*, 71:676-686
- Tufts, W. P. y Morrow, E. B. (1925). Fruit bud differentiation in deciduous fruits. *Hilgardia*, 1:3-14
- Tukey, H. B. y Young, J. O. (1939) Histological study of the developing fruit of the sour cherry. *Botanical Gazette*, 100:723-749
- Uma Shaanker, R. y Ganeshaiyah, K. N. (1989) Styler plugging by fertilized ovules in *Kleinovia hospita* (Sterculiaceae) - a case of vaginal sealing in plants? *Evolutionary Trends in Plants*, 3:59-64.
- Uma Shaanker, R., Ganeshaiyah, K. N. y Bawa, K. S. (1988). Parent-offspring conflict, sibling rivalry, and brood size patterns in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 19:177-205
- Uwate, W. J. y Lin, J. (1981) Development of the stigmatic surface of *Prunus avium* L. sweet cherry *American Journal of Botany*, 68:1165-1176
- Vemmos, S. N. (1995) Carbohydrate changes in flowers, leaves, shoots and spurs of 'Cox's Orange Pippin' apple during flowering and fruit setting periods. *Journal of Horticultural Science*, 70:889-900
- Vidaud, J. (1980) *L'abricotier*. CTIFL: Paris, Francia
- Vikman, P. A. y Vessey, J. K. (1993) Ontogenic changes on root nodule subpopulations of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): II Protein content and carbohydrate pools. *Journal of Experimental Botany*, 44:579-586
- Ward, H. M. (1892). *The Oak* D. Appleton Co : New York, New York, Estados Unidos.
- Watson, M. A. y Casper, B. B. (1984) Morphogenetic constraints on patterns of carbon distribution in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15:233-258

- Went, J. L. v. y Willemse, M. T. M. (1984) Fertilization. En: Johri, B. M. (Editores) *Embryology of Angiosperms* Springer-Verlag: Berlin, Alemania pp 273-218.
- Westwood, M. N. (1982). *Fruticultura de zonas templadas* Mundi-Prensa: Madrid, España.
- Wiens, D., Calvin, C. L., Wilson, C. A., Davem, C. I., Frank, D. y Seavey, S. R. (1987) Ovule survivorship, brood size, life history, breeding systems, and reproductive success in plants. *Oecologia*, 71:501-509.
- Williams, R. R. (1965) The effect of summer nitrogen applications on the quality of apple blossom *Journal of Horticultural Science*, 40:31-41
- Williams, R. R. (1970a). The effect of supplementary pollination in yield. En: Williams, R. R. y Wilson, D. (Editores) *Towards Regulated Cropping*. Grower Books: London, Reino Unido. pp. 7-10.
- Williams, R. R. (1970b) Techniques used in fruit-set experiments. En: Williams, R. R. y Wilson, D. (Editores) *Towards Regulated Cropping*. Grower Books: London, Reino Unido pp 57-61
- Wyatt, R. (1983) Pollinator - plant interactions and the evolution of breeding systems. En: Real, L. (Editores) *Pollination Biology*. Academic Press: Orlando, Florida, Estados Unidos. pp 51-95.
- Yates, I. E. y Sparks, D. (1994). Anatomy differs for aborting and nonaborting pistillate flowers in pecan. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119:949-955
- Young, H. J. y Stanton, M. L. (1990) Influence of environmental quality on pollen competitive ability in wild radish *Science*, 248:1631-1633.
- Zhong, Y., Mellerowicz, E. J., Lloyd, A. D., Leinhos, V., Riding, R. T. y Little, C. H. A. (1995) Seasonal variation in the nuclear genome size of ray cells in the vascular cambium of *Fraxinus americana*. *Physiologia Plantarum*, 93:305-311.

12. **ANEJO: PROGRAMAS INFORMATICOS ELABORADOS
PARA EL ANALIZADOR DE IMAGEN**

12. ANEJO: PROGRAMAS INFORMATICOS ELABORADOS PARA EL ANALIZADOR DE IMAGEN

Los programas empleados en el analizador de imagen "Quantiment 570" se han elaborado utilizando el lenguaje "QBASIC" desarrollado por Leica (Leica Cambridge, Cambridge, Reino Unido)

12.1. EVALUACION DEL CONTENIDO DE ALMIDON

```

10 rem *****
20 rem *
30 rem *           "MEDIDA DE LA DENSIDAD OPTICA"
40 rem *           "Almid04 qba"
50 rem *
60 rem *  PROGRAMA PARA MEDIDA DE DENSIDAD OPTICA DE ALMIDON
70 rem *           EN IMAGENES DE DISTINTAS ESTRUCTURAS FLORALES
80 rem *
90 rem *  Para cuantificar diferencias en el contenido de almidón en cortes de flores
100 rem *           de albaricoquero incluidas en parafina y teñidos con I2KI.
110 rem *
120 rem *           GL: Grey level (nivel de gris)
130 rem *           DO: Densidad óptica
140 rem *
150 rem *
160 rem *
170 rem *****
180 panel 0 0 80 25 1 14 2  "** MEDIDA DE DENSIDAD OPTICA DE ALMIDON  **
190 panel 5 2 70 20 3 0 1  ""
200 coltext 37:coltext 44
210 postext 3 14:print      "En primer lugar hay que comprobar las condiciones de
220 postext 4 10:print      "iluminación para que sean las mismas de una sesión a
230 postext 5 10:print      "otra: Filtro (nº2), luz centrada (con x16), objetivo
240 postext 6 10:print      "(x40), diafragma abierto a tope (se contrasta mejor
250 postext 7 10:print      "el almidón) Las muestras han de teñirse durante el mismo
260 postext 8 10:print      "intervalo de tiempo (cuando se comienza a medir una
270 postext 9 10:print      "se tiñe la siguiente)
280 postext 10 14:print     "Posteriormente hay que calibrar para poder comparar
290 postext 11 10:print     "valores de distintas sesiones
300 postext 12 10:print     "Una vez calibrado, hay que introducir los valores
310 postext 13 10:print     "obtenidos en el programa calibra
320 postext 14 10:print     "para calibrar la densidad óptica frente al GL
330 postext 15 14:print     "Los valores obtenidos mediante calibraDO no serán
340 postext 16 10:print     "exactamente iguales a los de measure-grey, pero sí
350 postext 17 10:print     "más correctos
360 postext 18 10:print     "HAY QUE SALVAR CADA VEZ QUE SE SALE DEL PROGRAMA
370 postext 18 10:print     "SI SE HA REALIZADO ALGUNA MODIFICACION
380 postext 19 16:print     "Seleccionar : 'C' para calibrar
390 postext 20 16:print     "                               'M' para medir

```

```

400 postext 21 16:print      "                'Q' para salir      "
410 key$ = inkey$ : if key$ = "" goto 410
420 if key$ = "C" then goto 460
430 if key$ = "M" then goto 980
440 if key$ = "Q" then goto 1480
450 goto 410

```

12 1.1. Calibrado del analizador de imagen

```

460 rem                                SUBPROGRAMA 1
465 panel 0 0 80 25 1 14 2 "*** CALIBRADO DEL ANALIZADOR DE IMAGEN **
470 GOSUB 1510
480 pausetext 1                       "Situación preparación y ajustar WL=100 en Green camera      "
490 pausetext 2                       "Situación 'blanco';ajustar blancos (Gain +-10) y                          "
500 pausetext 3                       "negros (Offset +-9,5) sin que se pierdan del histograma                    "
510 qmenu "image_setup"
520 pausetext 1                       "Distribución de luz: hacer shading sobre una zona de la                    "
530 pausetext 2                       "preparación sin material: sólo tinción(ya estará)                          "
540 pausetext 3                       "Comprobar histograma de negros y blancos tras shading                      "
550 qmenu "shading"
560 postext 7 24: print                "Seleccionar : 'C' para continuar                                           "
570 postext 8 24: print                "                'V' para volver a graduar el                               "
580 postext 9 24: print                "                histograma                                                  "
590 postext 10 24: print               "                'Q' para salir                                             "
600 coltext 46:coltext 31
610 gosub 1570
620 key$ = inkey$ : if key$ = "" goto 620
630 if key$ = "C" then goto 670
640 if key$ = "V" then goto 470
650 if key$ = "Q" then goto 1480
660 goto 620
670 pausetext 1                       "    Calibrado: elegir objetivo(x40)                                         "
700 qmenu "calibrate"
710 gosub 1510
720 pausetext 1                       "Situación la imagen 'blanca'(si no se ha movido estará)                   "
730 pausetext 2                       "Seleccionar Colour video                                                    "
740 qmenu 'image_setup'
750 pausetext 1                       "Adquirir la imagen 'blanca' en image 0                                     "
760 colmultiacquire 5 0 8
770 pausetext 1                       "Situación masking plane en OFF                                             "
780 pausetext 2                       "Medir Grey Level de 0 e introducir en OD=0.0 (+-250)                      "
790 qmenu 'measure_grey'
800 pausetext 1                       "Situación filtro n4 (DO=0.6)                                               "
820 qmenu 'image_setup'
830 pausetext 1                       "Adquirir la imagen 'N4' en image 0                                         "
840 colmultiacquire 5 0 8
850 pausetext 1                       "Medir Grey Level de 0 e introducir en OD=0.6 (+-90)                       "
860 qmenu 'measure_grey'

```

```

870 panel 10 5 60 10 3 0 1 ""
880 postext 9 28 :coltext 46:coltext 31: print "Calibrado finalizado"
890 postext 15 28 :coltext 46:coltext 31: print "Introducir valores en 'calibra'"
900 postext 17 28 :coltext 46:coltext 31: print "SALIMOS DEL PROGRAMA almid04"
910 postext 18 28 :coltext 46:coltext 31: print "SALVANDOLO Y NOS VAMOS A calibraDO"
920 postext 19 28 :coltext 46:coltext 31: print "TAMBIEN LO SALVAMOS"
930 delay = 1000
940 delay = delay - 1
950 if delay > 1 then goto 940
960 goto 180
970 rem *****FIN DEL CALIBRADO*****

```

12 1 2. Medida de la densidad óptica

```

980 rem SUBPROGRAMA 2
990 panel 0 0 80 25 1 14 2 *** MEDIDA DE DENSIDAD OPTICA ***
1000 panel 5 2 70 20 3 0 1 ""
1010 coltext 37:coltext 44
1020 rem
1030 data "Ovario WN","Ovario WS","Ovario EN","Ovario ES","Tip"
1040 data "Teg W","Teg E"
1050 rem DIM es para dimensionar la lista o vector: en este caso, 7
1060 dim t$(7)
1070 rem chr$ es funcion para intercalar un caracter; el 9 es ','
1080 ta$=chr$(9)
1090 for i=1 to 7
1100 read t$(i)
1110 next i
1120 dim gdata(264),lut(256)
1130 open #2 "calibraDO dat"
1140 for i=1 to 256
1150 input #2: lut(i)
1160 next i
1170 close #2
1180 cls
1190 input "nombre del fichero? (max. 8 letras. Sin ext):", nf$
1200 open #1 "a:" + nf$ + ".xls"
1210 input "Nombre preparación", n$
1220 for k=1 to 7
1230 pausetext 1 "Bloque: " + n$ + " Imagen: " + t$(k)
1240 qmenu 'image_setup'
1250 mframe 148 145 220 220
1260 iframe 148 145 220 220
1270 colmultiacquire 5 0 8
1280 coldetect 0 62 244 19 158 0 88 4
1290 rem qmenu 'coldetect'
1300 loadrad lut(1)
1310 measrad 0,4,gdata(1)

```

```

1320 print #1: n$,ta$,t$(k);ta$;gdata(1)*calvalue^2;ta$;gdata(2);ta$;gdata(3)
1330 print n$,t$(K),gdata(1)*calvalue^2,gdata(2),gdata(3)
1340 next k
1350 coltext 37:coltext 35
1360 print          "Seleccionar:                "
1370 print          "                'M' para medir otro corte      "
1380 print          "                'F' para material de otro día      "
1390 print          "                (será necesario otro archivo) "
1400 print          "                'Q' para salir          "
1410 key$ = inkey$ : if key$ = "" goto 1410
1420 if key$ = "M" then goto 1210
1430 if key$ = "F" then goto 1450
1440 if key$ = "Q" then goto 1470
1450 close #1
1460 goto 1180
1470 close #1
1480 cls: quic
1490 stop
1500 rem =====
1510 rem ESPERA
1520 panel 0 0 80 25 1 14 2 ""
1530 panel 10 5 60 10 3 0 1 " TRABAJANDO "
1540 postext 20 20 :PRINT "ESPERE POR FAVOR"
1550 coltext 46: coltext 31
1560 return
1570 REM SELECCION
1580 panel 10 19 60 3 3 0 1 ""
1590 postext 20 20 :print "Presionar la tecla APROPIADA para continuar "
1600 return

```

12 1.3 Calibrado de la densidad óptica

```

10 rem *****
20 rem *
30 rem *           "CALIBRADO DE LA DENSIDAD OPTICA"
40 rem *           "Almid04.qba"
50 rem *
60 rem *           PROGRAMA PARA EL CALIBRADO DE LA DENSIDAD OPTICA
70 rem *           DE LOS VALORES DE GL OBTENIDOS EN EL SUBPROGRAMA 1
80 rem *
90 rem *           Para obtener la recta de calibrado de la densidad óptica,
100 rem *              ajustando los valores extremos
110 rem *
120 rem *              GL: Grey level (nivel de gris)
130 rem *              DO: Densidad optica
140 rem *
150 rem *
160 rem *
170 rem *****
175 rem              SUBPROGRAMA 3
180 panel 0 0 80 25 1 14 2 "*** CALIBRADO DE LA DENSIDAD OPTICA **
190 panel 5 2 70 20 3 0 1 ""
210 rem programa para crear fichero con calibrado de densidad opti ca
220 dim c(256)
230 input "Introducir nivel de gris para DO=0 :";n0
240 input "Introducir nivel de gris para DO=0.6 :";n6
250 rem m es la densidad 0.6 convertida en transmitancia
260 m=10^(2-0.6)
270 open #1 "calibraDO.dat"
280 f = (100 - m) / (n0 - n6)
300 for i=n0 to 1 step-1
310 c(i)=100 - f*(n0-i)
320 if c(i)<5 then c(i)=5
321 next i
330 for i=n0+1 to 256
340 c(i)=100
350 next i
360 for i=1 to 256
390 c(i) = 2 -log10(c(i))
400 print #1:c(i)
410 next i
420 close #1
430 end

```

12.2 MEDIDA DEL TAMAÑO DE OVULOS

```

10 rem *****
20 rem *
30 rem *           "MEDIDA DE SUPERFICIE (A)"
40 rem *           "Medir2D3 qba"
50 rem *
60 rem *           PROGRAMA PARA MEDIR MAGNITUDES EN EL PLANO:
70 rem *           AREA, LONGITUD, ANCHURA Y ASPECT RATIO (L/A)
80 rem *
90 rem *           APLICACION: MEDIDA DE LAS DIMENSIONES DE OVULOS
100 rem *          DE FLORES DE ALBARICOQUERO INCLUIDAS EN
110 rem *          PARAFINA Y CORTADAS A 10 µm
120 rem *****
130 panel 0 0 80 25 1 14 2 "***MEDIDA DE OVULOS: Area,longitud,anchura ***"
140 panel 5 10 70 15 3 0 1 ""
150 ta$=chr$(9)
160 rem gdata 26 y lut 256
170 dim gdata (26),lut(256)
180 postext 15 10
190 input "nombre del fichero?(sin ext):",nf$
200 open #1 "A:" + nf$ + ".xls"
210 postext 16 10
220 input "Fecha actual?:",f$
230 postext 17 10
240 input "Material?:",m$
250 pausetext 1 "Como los óvulos son demasiado grandes para el microscopio,"
260 pausetext 2 "es necesario usar la lupa: cuidado que los aumentos elegidos"
270 pausetext 3 "correspondan a 'Macroviewer'
280 qmenu 'calibrate'
285 mframe 0 8 512 494
286 iframe 0 0 512 512
290 print #1: "Fecha:" + f$;ta$;"Material:" + m$
300 print #1: "Bloque";ta$;"Area";ta$;"Longitud";ta$;"Anchura";ta$;"(L/A):1000"
310 postext 18 10
320 print "nombre preparación?";
330 input n$
340 pausetext 1 "Bloque:  " + n$
350 pausetext 2 "Situación preparación"
360 pausetext 3 ""
370 qmenu 'image_setup'
380 multiacquire 5 0 8
390 rem Si por la luz o el material no se detecta bien, cambiar el threshold
400 thresh 0 1 0 200
410 pausetext 2 "La secuencia normal es:CUT (separar lo que nos interesa)
420 pausetext 3 "KEEP (mantener sólo lo bueno) y COVER (rellenar huecos)
430 qmenu 'bin_edit'
440 rem Los n°s son las variables a medir;la tabla está en el manual (vol 2,
450 rem pag 211). 2 y 3 (Xfcp e Yfcp) parece que hay que elegir las siempre:

```

```

460 rem las necesitará el programa Ojo,anchura=breath,no width.
470 setftrpar "1,2,3,8,33,9"
480 rem 3 ceros: nº de variable y límites de discriminación.
490 ftrgrey 0 : measfeat 1 0 0 0 : clraccept
500 rfeatres 0,1,gdata(1)
510 rfeatres 0,2,gdata(2)
520 rfeatres 0,3,gdata(3)
530 rfeatres 0,8,gdata(4)
540 rfeatres 0,9,gdata(5)
550 rfeatres 0,33,gdata(6)
560 rem los valores de rfeatres no están calibrados; hay que multiplicarlos
570 rem por 'calvalue': equivalencia que introducimos en Calibrate.
580 print
#1:n$;ta$;gdata(1)*calvalue^2;ta$;gdata(4)*calvalue;ta$;gdata(5)*calvalue;ta$;gdata(6)/1000
590 postext 24 10
600 print n$,gdata(1)*calvalue^2,gdata(4)*calvalue,gdata(5)*calvalue,gdata(6)/1000
610 panel 5 2 70 20 3 0 1 ""
620 coltext 37:coltext 44
630 postext 7 24: print "Seleccionar:           "
640 postext 8 24: print "      'M' para medir otra preparación      "
650 postext 9 24: print "      'F' para finalizar la sesión          "
660 postext 10 24: print "              (será necesario otro archivo)  "
670 key$ = inkey$ : if key$ = "" goto 670
680 if key$ = "M" then goto 320
690 if key$ = "F" then goto 710
700 goto 670
710 close #1
720 cls:quic
730 stop
740 end

```

12.3. MEDIDA DEL TAMAÑO DE OVARIOS

```

10 rem *****
20 rem *
30 rem *           "MEDIDA DE LONGITUD (L)"
40 rem *           "Medir1D1 qba"
50 rem *
60 rem *     PROGRAMA PARA MEDIR LONGITUDES
70 rem *
80 rem *     APLICACION: MEDIDA DEL GROSOR DEL PERICARPIO
90 rem *     DE FLORES DE ALBARICOQUERO INCLUIDAS EN
100 rem *     PARAFINA Y CORTADAS A 10 µm.
110 rem *
120 rem *****
130 panel 0 0 80 25 1 14 2 "***MEDIDA DEL GROSOR DEL PERICARPO***"
140 postext 15 10
150 PRINT "Anchura entre óvulo y exterior del pericarpo"
160 panel 5 10 70 15 3 0 1 ""
170 ta$=chr$(9)
180 rem gdata 26 y lut 256
190 dim gdata (26),lut(256)
200 postext 15 10
210 input "nombre del fichero?(sin ext):",nf$
220 open #1 "a:" + nf$ + ".xls"
230 postext 16 10
240 input "Fecha actual?:",f$
250 postext 17 10
260 input "Material?:",m$
270 pausetext 1 "Como los ovarios son demasiado grandes para el microscopio,
280 pausetext 2 "es necesario usar la lupa: atención que los aumentos elegidos
290 pausetext 3 "correspondan a 'Macroviewer'
300 qmenu 'calibrate'
310 mframe 0 8 512 494
320 iframe 0 0 512 512
330 print #1: "Fecha:" + f$;ta$;"Material:" + m$
340 print #1: "Bloque";ta$;"Longitud"
350 postext 18 10
360 print "nombre preparación?:";
370 input n$
380 pausetext 1 "Bloque:  " + n$
390 pausetext 2 "Situación preparación"
400 pausetext 3 ""
410 qmenu 'image_setup'
420 multiacquire 5 0 8
430 pausetext 2 "Con COVER trazar una línea lo más recta posible,
440 pausetext 3 "pero no indispensable recta (el analizador unirá los 2 puntos)
450 qmenu 'bin_edit'
460 rem Los números son las variables a medir;la tabla está en el manual (vol 2,
470 rem pag 7-8). Las 2 y 3 (Xfcp e Yfcp) hay que elegirías siempre:

```

```
480 setftrpar "2,3,8"
490 rem 3 ceros: n° de variable y límites de discriminación.
500 ftrgrey 0 : measfeat 1 0 0 0 : clraccept
510 rfeatres 0,2,gdata(2)
520 rfeatres 0,3,gdata(3)
530 rfeatres 0,8,gdata(4)
540 rem los valores de rfeatres no están calibrados; hay que multiplicarlos
550 rem por 'calvalue': equivalencia que introducimos en Calibrate
560 print #1:n$;ta$;gdata(4)*calvalue
570 postext 24 10
580 print n$,gdata(4)*calvalue
590 panel 5 2 70 20 3 0 1 ""
600 coltext 37:coltext 44
610 postext 7 24: print "Seleccionar:                "
620 postext 8 24: print "      'M' para medir otra preparación          "
630 postext 9 24: print "      'F' para finalizar la sesión              "
640 postext 10 24: print "                (será necesario otro archivo)  "
650 key$ = inkey$ : if key$ = "" goto 650
660 if key$ = "M" then goto 360
670 if key$ = "F" then goto 690
680 goto 650
690 close #1
700 cls:quic
710 stop
720 end
```