VASCULARIZACIÓN Y GRANOS DE ALMIDÓN DURANTE LA MORFOGÉNESIS EN YEMAS FLORALES DE DURAZNERO CON DIFERENTE FECHA DE FLORACIÓN

VASCULARIZATION AND STARCH GRAINS DURING THE MORPHOGENESIS OF PEACH FLORAL BUDS ON DIFFERENT FLOWERING DATE

Horacio **Santiago-Mejía**[1], Hilda Araceli **Zavaleta-Mancera**[2*], José Isabel **Cortés-Flores**[3], Antonio **Turrent-Fernández**[4], Rocío **Albino-Garduño**[1]

[1]Universidad Intercultural del Estado de México. Libramiento Francisco Villa S/N, Centro, San Felipe del Progreso, Estado de México. 50640. [2]Botánica (arazavaleta@colpos.mx). Unidad de Microscopía Electrónica. [3]Edafología. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. [4]Campo Experimental Valle de México. INIFAP. Carretera los Reyes-Texcoco, Km 13.5. Coatlinchán, Texcoco, Estado de México. 56250.

RESUMEN

Los aspectos anatómicos de la vascularización y distribución de almidón durante la morfogénesis de la yema floral no se conocen en *Prunus persica* (L.), y este conocimiento ayuda a predecir el grado de vascularización y susceptibilidad de la yema al frío. El objetivo del presente estudio fue comparar la diferenciación de xilema y la distribución de almidón, en yemas florales, desde el estado fenológico (EF) "reposo" a "estambres visibles", en los cultivares Puebla, CP Precoz y Zacatecas (floración precoz, intermedia y tardía). El muestreo fue completamente al azar (dos yemas florales de la parte media de cinco ramillas mixtas (de un año), de 10 árboles (por cultivar) del 29 de octubre (otoño) al 19 marzo (invierno) de 2012. Los tejidos se fijaron en solución de formaldehído-alcohol-agua (FAA) y procesados en Paraplast. Cortes seriados se tiñeron con Safranina O y Verde fijo FCF. Los cambios anatómicos observados fueron consistentes para cada EF estudiado, independiente del cultivar y fecha de floración. Al inicio del EF "reposo" no hubo conexión vascular entre el pedicelo y el ovario. En el EF "yema hinchada" el xilema llegó a la base del ovario y el almidón se observó en el ovario y anteras. En el EF "yemas con cáliz visible" el xilema llegó al estigma y el almidón persistió en el ovario y anteras. En el EF "punta rosada" la antera maduró y no presento almidón. En EF "estambres visibles" el estigma y el óvulo maduraron y el almidón fue casi ausente. La presencia de almidón precedió a la diferenciación del xilema. La vascularización en los verticilos

ABSTRACT

The anatomical aspects of vascularization and distribution of starch during the morphogenesis of the floral bud are unknown for *Prunus persica* (L.), and this knowledge helps to predict the degree of vascularization and susceptibility of the bud to cold temperatures. The aim of the present study was to compare the differentiation of the xylem and the distribution of starch in flower buds, from the phenological stage (PS) "dormancy" to "visible stamens" in the Puebla, CP Precoz and Zacatecas cultivars (early, intermediate and late flowering). Sampling was carried out completely at random (two flower buds of the middle part of five mixed twigs (one year old), from 10 trees (per cultivar) from October 29th (autumn) to March 19th (winter), 2012. The tissues were fixed in a formaldehyde -alcohol-water (FAA) solution, and processed in Paraplast. Serial sections were stained using Safranin O and Fast green FCF. The anatomical changes observed were consistent for each PS studied, regardless of the cultivar and flowering date. At the start of the PS "dormancy" there was no vascular connection between the pedicel and the ovary. In the PS "swollen bud," the xylem reached the base of the ovary and starch was found in the ovary and anthers. In the PS "buds with visible calyx," the xylem reached the stigma and the starch remained in the ovary and anthers. In the PS "pink tip," the anther matured and presented no starch. In the PS "visible stamens," the stigma and the ovule matured and starch was almost absent. The presence of starch preceded the differentiation of the xylem. The vascularization in the vegetative whorls was delayed in the intermediate and late cultivars, in contrast with the early cultivar.

* Autor responsable ❖ Author for correspondence.
Recibido: mayo, 2018. Aprobado: octubre, 2018.
Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 52: 1121-1135. 2018.

vegetativos se retrasó en los cultivares intermedio y tardío en contraste con el cultivar temprano.

Palabras clave: *Prunus persica*, vascularización, almidón, anteras, yemas en reposo.

INTRODUCCIÓN

Los frutales caducifolios se caracterizan por un periodo de baja actividad hormonal y metabólica en los meristemos, el cual es denominado "reposo". Este periodo es una adaptación a los inviernos fríos (Horvath, 2009) que permite desarrollar mecanismos de resistencia a los daños por frío (Elle y Sauter, 2000; Campoy *et al*., 2011). La aclimatación al frío de las yemas florales en varias especies de *Prunus* L. está determinada por factores genéticos (Arora y Wisniewski, 1994; Yamane *et al*., 2011), fisiológicos, bioquímicos (González-Rossia *et al*., 2008; Die y Rowland, 2014), morfológicos y anatómicos (Ashworth, 1982; 1984). Las temperaturas bajas se requieren para satisfacer las necesidades fisiológicas de las yemas florales (Andreini *et al*., 2014). Una deficiencia en horas frío provoca floración deficiente, malformaciones en los verticilos vegetativos y reproductivos (Nava *et al*., 2009; Reig *et al*., 2013). Al final del "reposo", la yema floral del duraznero tiene cambios bioquímicos, fisiológicos y anatómicos relacionados con el establecimiento de la conexión vascular, lo cual aumenta el riesgo de congelación (Ashworth, 1982; 1984; Wisniewski y Davis, 1989), pero no se conoce con precisión cuando y en que tejidos de la yema sucede la diferenciación del xilema, tejido responsable de la acumulación de agua en los tejidos. En el "reposo" la actividad enzimática aumenta y la concentración de azúcares disminuye, lo cual aumenta la susceptibilidad al frío de las yemas florales de duraznero (Palonen, 1999) y la concentración baja del almidón en el duraznero y peral (*Pyrus communis* L.) (Ito *et al*., 2002 y González-Rossia *et al*., 2008), pero no se conoce la secuencia de estos eventos en relación con el estado fenológico y fecha de floración. Respecto al desarrollo de la antera, en chabacano (*Prunus armeniaca* L.) el cambio de color de las anteras se asocia a la meiosis y al fin del "reposo" de las yemas (Julian *et al*., 2014). Reinoso *et al*. (2002) describieron el desarrollo anatómico de las yemas florales de duraznero desde un punto de vista botánico, pero no revisaron la diferenciación del tejido

Key words: *Prunus persica*, vascularization, starch, anthers, dormant buds.

INTRODUCTION

Deciduous fruit trees characteristically undergo a period of low hormonal and metabolic activity in the meristems, which is called "dormancy." This period is an adaptation to cold winters (Horvath, 2009), which helps it to develop resistance mechanisms against damages from low temperatures (Elle and Sauter, 2000; Campoy *et al*., 2011). The acclimatization to low temperatures of flower buds in several species of *Prunus* L. is determined by genetic (Arora and Wisniewski, 1994; Yamane *et al*., 2011), physiological, biochemical (González-Rossia *et al*., 2008; Die and Rowland, 2014), morphological and anatomical (Ashworth, 1982; 1984) factors. Low temperatures are required to satisfy the physiological needs of the flower buds (Andreini *et al*., 2014). A deficiency of chilling hours causes deficient flowering, malformations in the vegetative and reproductive whorls (Nava *et al*., 2009; Reig *et al*., 2013). At the end of the "dormancy" stage, the flower bud of the peach tree has biochemical, physiological and anatomical changes related with the establishment of the vascular connection, which increases the risk of freezing (Ashworth, 1982; 1984; Wisniewski and Davis, 1989), although there is no exact knowledge regarding the exact moment and bud tissues in which the differentiation of the xylem, the tissue responsible for the accumulation of water in tissues, takes place. While "dormant," enzyme activity increases and the concentration of sugars decreases, which increases the susceptibility to chilling of peach flower buds (Paloen, 1999) and the concentration of starch decreases in peach and pear trees (*Pyrus communis* L.) (Ito *et al*., 2002 and González-Rossia *et al*., 2008), yet there is no knowledge on the sequence of these events in relation to the phenological stage and date of flowering. Regarding the development of anthers in apricot (*Prunus armeniaca* L.), the change in color of the anthers is related to meiosis and to the end of the buds "dormant" stage (Julian *et al*., 2014). Reinoso *et al*. (2002) described the anatomical development of peach flower buds from a botanical point of view, but did not review the differentiation of the vascular tissue or the presence of starch grains. The xylem is responsible for conducting water to the

vascular ni la presencia de granos de almidón. El xilema es el responsable de conducir el agua hacia las yemas y el almidón es una importante fuente de energía para la morfogénesis; la descripción minuciosa de estos eventos en duraznero es una herramienta eficaz en el manejo agronómico y reducción de daño por heladas. El objetivo del presente estudio fue caracterizar el desarrollo del xilema y la distribución de granos de almidón, en cinco estados fenológicos (EF), desde el EF "reposo" hasta el EF "estambres visibles" en tres cultivares de *P. persica* con diferentes fechas de floración. En el supuesto de que la diferenciación del xilema esté relacionada con un estado fenológico particular de la yema floral, esto permitirá predecir el grado de vascularización y la susceptibilidad al frío en cultivares con diferente fecha de floración.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y sitio experimental

Los cultivares de *Prunus persica* usados y fechas de antesis fueron: Puebla (12 enero, precoz), CP Precoz (20 febrero, intermedio) y Zacatecas (17 marzo, tardío) durante el invierno 2011-2012. Los árboles de cinco años de edad estaban injertados en duraznero criollo. La huerta está en el Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX), el Horno, Chapingo, Texcoco, Estado de México, (19° 29' 17" N y 98° 53' 41" O, altitud de 2280 m), con suelo fluvisol móllico (Govaerts *et al.*, 2008) clima templado subhúmedo C (W_0), temperatura y precipitación media anual de 15.5 °C y 644 mm (García, 1987).). Los árboles se estructuraron según el método Tatura Modificado y la huerta se plantó en el sistema milpa intercalada con árboles frutales (MIAF) (Santiago-Mejía *et al.*, 2015). Las prácticas culturales fueron: fertilización 60-15-60 (g de N-P_2O_5-K_2O) y 3 kg de pollinaza por árbol, en abril (1/3; 1-1-0 de N, P, K, pollinaza) y agosto (2/3; 0-0-1 de N, P, K, pollinaza); riego por gravedad sin restricción de humedad.

Muestreo y diseño experimental

El muestreo se realizó completamente al azar y se tomaron dos yemas florales centrales de cinco ramillas mixtas de un año, de la parte media del dosel de 10 árboles por cultivar. Con la finalidad de cubrir la fenología de los tres cultivares se realizaron siguientes muestreos: 29 de octubre, 18 de noviembre, 08 de diciembre y 28 de diciembre de 2011 y 17 de enero, 30 de enero, 06 de febrero, 23 de febrero, 26 de febrero, 01, 17 y 21 de marzo de 2012. Los caracteres anatómicos revisados fueron cualitativos, por lo cual no se realizó un análisis estadístico. Los resultados

buds and starch is an important source of energy for the morphogenesis; the detailed description of these events in peach trees is an efficient tool in agronomic management and reduction of damages caused by frost. The aim of the present study was to characterize the development of the xylem and the distribution of starch grains in five phenological stages (PS), from PS "dormant" to the PS "visible stamens" in three *P. persica* cultivars with different flowering dates. Assuming that the differentiation of the xylem is related to a particular phenological stage of the flower bud, this would help predict the degree of vascularization and susceptibility to low temperatures in cultivars with different flowering dates.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and experimental site

The *Prunus persica* cultivars used and dates of anthesis were as follows: Puebla (January 12th, early), CP Precoz (February 20th, intermediate) and Zacatecas (March 17th, late) during the winter of 2011-2012. The five-year old trees were grafted onto creole peach trees. The orchard is located in the Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX), el Horno, Chapingo, Texcoco, Estado de México, (19° 29' 17" N y 98° 53' 41" W, altitude 2280 m), with *Mollic* fluvisol soil (Govaerts *et al.*, 2008) a temperate subhumid climate C (W_0), temperature and annual rainfall of 15.5 °C and 644 mm (García, 1987).). The trees were structured according to the Modified Tatura method and the orchard was planted in the milpa intercropped with fruit trees (MIFT) system (Santiago-Mejía *et al.*, 2015). Cultural practices were: fertilization 60-15-60 (g of N-P_2O_5-K_2O) and 3 kg of poultry manure per tree in April (1/3; 1-1-0 de N, P, K, poultry manure) and August (2/3; 0-0-1 de N, P, K, poultry manure); irrigation by gravity without limits of water.

Sampling and experimental design

Sampling was carried out completely at random and two central flower buds were taken, with five mixed one-year-old twigs, from the middle section of the canopies of 10 trees to be planted. In order to cover the phenology of the three cultivars, three sample collections were carried out: October 29th; November 18th; December 08th and 28th of 2011 and January 17th and 30th; February 06th, 23rd and 26th, and March 01st, 17th y 21st of 2012. The anatomic characteristics reviewed were qualitative, and therefore a statistical analysis was not carried out.

son representativos de todas las yemas analizadas en cada estado fenológico.

Estados fenológicos y etapas anatómicas

Las yemas florales se clasificaron en los EF de acuerdo con la nomenclatura de Baggiolini (1952): A: "yema en reposo"; B: "yema hinchada"; C: "cáliz visible"; D: "punta rosada"; y E: "estambres visibles". Para cada EF se describieron los cambios anatómicos, los cuales se agruparon en "etapas anatómicas" de acuerdo con la nomenclatura sugerida por Reinoso *et al*. (2002). Siete etapas anatómicas (1-7) se describen en el EF "A", dos etapas anatómica (8 y 9) en el EF "B", una etapa anatómica (10) en el EF "C", y en la EF "D" y "F" solo se describen los cambios morfológicos, por tratarse de la emergencia de las anteras del botón floral y de la apertura floral o antesis. Las características morfológicas de estos estados fenológicos se ilustran en la Figura 1.

Microtecnia para la anatomía de las yemas

La morfología externa de las yemas, en cada estado fenológico, se documentó con una cámara Moticam 2000® (Motic,

The results are representative of all the buds analyzed in each phenological stage.

Phenological stages and anatomical stages

The flower buds were classified in the PS's according to Baggiolini's nomenclature (1952): A: "dormant bud"; B: "swollen bud"; C: "visible calyx"; D: "pink tip"; and E: "visible stamen." For each PS, anatomical changes were described, which were grouped in "anatomical stages," according to the nomenclature suggested by Reinoso *et al*. (2002). Seven anatomical stages (1-7) were described in PS "A", two anatomical stages (8 and 9) in PS "B", one anatomical stage (10) in PS "C", and in PS "D" and "F" only morphological changes are described, since they refer to the emergence of the anthers of the floral bud and the anthesis or floral aperture. The morphological characteristics of these phenological stages are illustrated in Figure 1.

Microtechnic for buds anatomy

The external morphology of the buds was documented in each phenological stage using a Moticam 2000® camera (Motic,

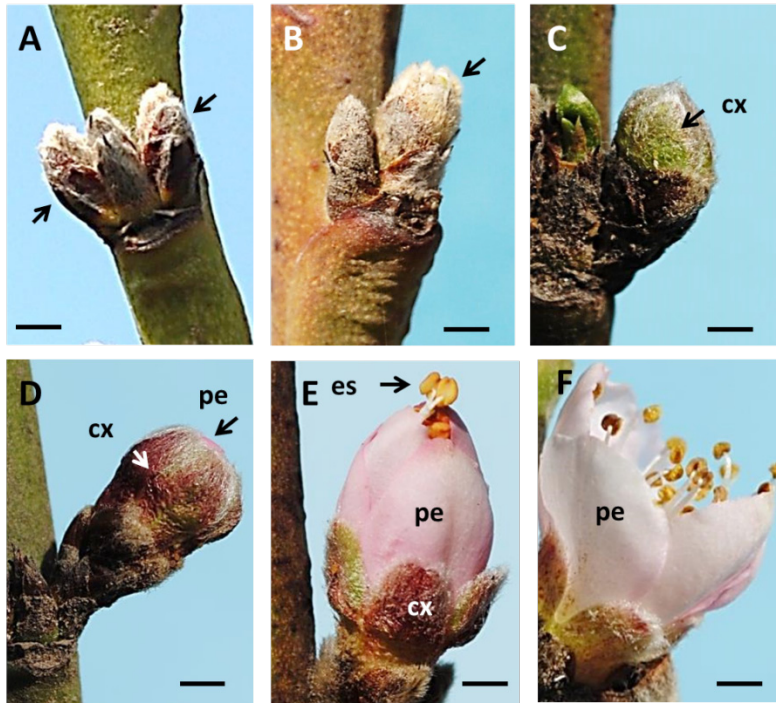

Figura 1. Estados fenológicos de las yemas florales estudiados. A) yema en reposo; B) yema hinchada; C) cáliz visible; D) punta rosada; E) estambres visibles; F) antesis. Las imágenes corresponden al cv. Zacatecas. cx: cáliz; pe: pétalos; es: estambres. Barra = 1 cm.

Figure 1. Figure 1. Phenological stages of the flower bud studied. A) dormant bud; B) swollen bud; C) visible calyx; D) Pink tip; E) visible stamens; F) anthesis. The image corresponds to cv. Zacatecas. cx: calyx; pe: petals; es: stamens. Bar = 1 cm.

China), acoplada a un estéreo-microscopio (Nikon SMZ800®, Japón). Las yemas se fijaron en FAA (10 % formalina, 50 % etanol, 5 % ácido acético glacial, 35 % agua desionizada) durante 48 h y se procesaron para inclusión en Paraplast. Cortes longitudinales (micrótomo rotatorio, American Optical, USA) se tiñeron con Safranina O y Verde fijo FCF. La Safranina O es un colorante catiónico (básico) que tiñe en rojo las paredes lignificadas y ácidos nucleicos, por lo cual se usó para identificar los vasos maduros del xilema. El Verde fijo FCF es un colorante aniónico (ácido) verde que tiñe la celulosa, citoplasma, elementos de tubo criboso, parénquima y células meristemáticas, que en combinación con la Safranina, produce una tinción metacromatica (Baker, 1966). La anatomía de las yemas se estudió con un microscopio Axioskop 2 plus® (Carl Zeiss, Alemania) y una cámara Axiocam 5 MRc (Carl Zeiss, Alemania).

Vascularización y distribución de granos de almidón

La aparición de vasos de xilema en el receptáculo, cáliz, corola, anteras y gineceo se registró con un microscopio Axioskop 2 plus® (Carl Zeiss; Alemania) en campo claro. Los granos de almidón se visualizaron con epifluorescencia (excitación BP 450-490 nm y emisión LP 515 nm) y las imágenes se capturaron con la cámara Axiocam 5 MRc (Carl Zeiss, Alemania).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fenología de la floración

El primer cultivar en salir del "reposo" (A) fue Puebla (finales de diciembre), después CP Precoz (a finales de enero) y al final Zacatecas (finales de febrero). El desarrollo de la yema fue rápido en el cv. Puebla y en enero presento sépalos visibles (EF "C") (Figura 2). El desarrollo de la yema del cv. CP Precoz fue más lento, el cáliz fue visible (EF "D") posterior al del cv. Puebla. El cultivar más tardío fue el Zacatecas; la yema permaneció en reposo (EF "A") hasta febrero, luego se desarrolló rápidamente presentando la punta rosada (EF"D") en marzo.

Vascularización de la yema floral

La diferenciación del xilema, en la yema floral, fue acrópeta (la maduración de los elementos de vaso inició en la base y avanzó hacia la punta de la yema) en los tres cultivares. Durante el reposo (A1 a A5), la yema de los tres cultivares no está vascularizada. El cv. Puebla fue el primero (28 diciembre) en presentar

China), attached to a stereoscopic microscope (Nikon SMZ800®, Japan). The buds were fixed in FAA (10 % formalin, 50 % ethanol, 5 % glacial acetic acid, 35 % deionized water) for 48 h and processes for their inclusion in Paraplast. Lengthwise cuts (rotary microtome, American Optical, USA) were dyed using Safranin O and Fast Green FCF. Safranin O is a cationic (basic) colorant that dyes lignified walls and nucleic acids red, which is why it was chosen to identify the mature xylem vessels. Fast Green FCF is an anionic (acid) green dye that stains cellulose, cytoplasm, sieve tube elements, parenchyma and meristematic cells, that in combination with Safranin provide a metachromatic stain (Baker, 1966). The anatomy of the buds was studied under a Axioskop 2 plus® microscope (Carl Zeiss, Germany) and an Axiocam 5 MRc camera (Carl Zeiss, Germany).

Vascularization and distribution of starch grains

The appearance of xylem vessels in the receptacle, calyx, corolla, anthers and gynoecium was registered using a Axioskop 2 plus® microscope (Carl Zeiss; Germany) in a bright field. The starch grains were viewed with epifluorescence (excitation BP 450-490 nm and emission LP 515 nm), and images were captured using the Axiocam 5 MRc camera (Carl Zeiss, Germany).

RESULTS AND DISCUSSION

Phenology of flowering

The first cultivar to leave the stage of "dormancy" (A) was Puebla (late December), followed by CP Precoz (late January), and finally, Zacatecas (late February). The development of the bud was fast in cv. Puebla, and by January, it was showing visible sepals (PS "C") (Figure 2). The development of the bud for cv. CP Precoz was slower, since the calyx became visible (PS "D") after it did in cv. Puebla. The slowest cultivar was Zacatecas; the bud remained dormant (PS "A") until February, and then it developed quickly, displaying the pink tip (PS"D") in March.

Vascularization of the flower bud

The differentiation of the xylem in the flower bud was acropetal (the maturation of vessel elements began at the base and moved towards the bud) in all three cultivars. During the dormant stage (A1 to A5), the bud of the three cultivars is not vascularized. The cv. Puebla was the first (December 28th) to present xylem in the receptacle, calyx and corolla (A6

xilema en el receptáculo, cáliz y corola (A6 y A7) (Figura 2 y 3). En contraste, la ausencia de vascularización se prolongó en CP precoz (30 de enero) y en Zacatecas (23 febrero) (Figura 2 y 3A). La vascularización de la yema inició a los 2 meses en el cv. Puebla, a los 3 meses en el cv. CP Precoz y a los 4 meses en el cv. Zacatecas (Figura 2 y 3B). En el receptáculo, solo celulas procambiales vasculares fueron observadas (Figura 4A). En las etapas A3, A 4 y A5, el xilema se observó en las escamas basales (Figura 3A). La vascularización de las anteras y ovario se presentó primero en el cv. Puebla (yema hinchada B8 y B9) el 17 enero, y el más tardío (14 marzo) fue Zacatecas (Figura 2 y Figura 3B). La vascularización del estilo presentó la mayor variación entre cultivares: en el cv. Puebla sucedió en 15 d (del 17 al 30 de enero), en CP Precoz en 27 d (del 30 enero al 26 de febrero), y en el cv. Zacatecas en 4 d (del 17 al 21 de marzo).

La vascularización de la yema a finales de reposo se reportó para *P. armeniaca, P. avium, P. ceratus, P. saliciana y P. sargentii* (Ashworth, 1984; Reinoso

and A7) (Figures 2 and 3). In contrast, the lack of vascularization was prolonged in CP Precoz (January 30th) and in Zacatecas (February 23rd) (Figures 2 and 3A). Bud vascularization begun after 2 months in cv. Puebla, after 3 months in cv. CP Precoz and after 4 months in cv. Zacatecas (Figures 2 and 3B). Only vascular procambial cells were observed in the receptacle (Figure 4A). In stages A3, A 4 and A5, the xylem was observed in the basal scales (Figure 3A). The vascularization of anthers and ovary took place first in cv. Puebla (swollen bud B8 and B9) on January 17th, and the latest (March 14th) was Zacatecas (Figures 2 and 3B). The vascularization of the style presented the greatest variation between cultivars: in cv. Puebla, it occurred on day 15 (January 17th to 30th), in CP Precoz, on day 27 (January 30th to February 26th), and in cv. Zacatecas, on day 4 (from March 17th to 21st).

Vascularization was reported at the end of the stage of dormancy for *P. armeniaca, P. avium, P. ceratus, P. saliciana* and *P. sargentii* (Ashworth, 1984; Reinoso *et*

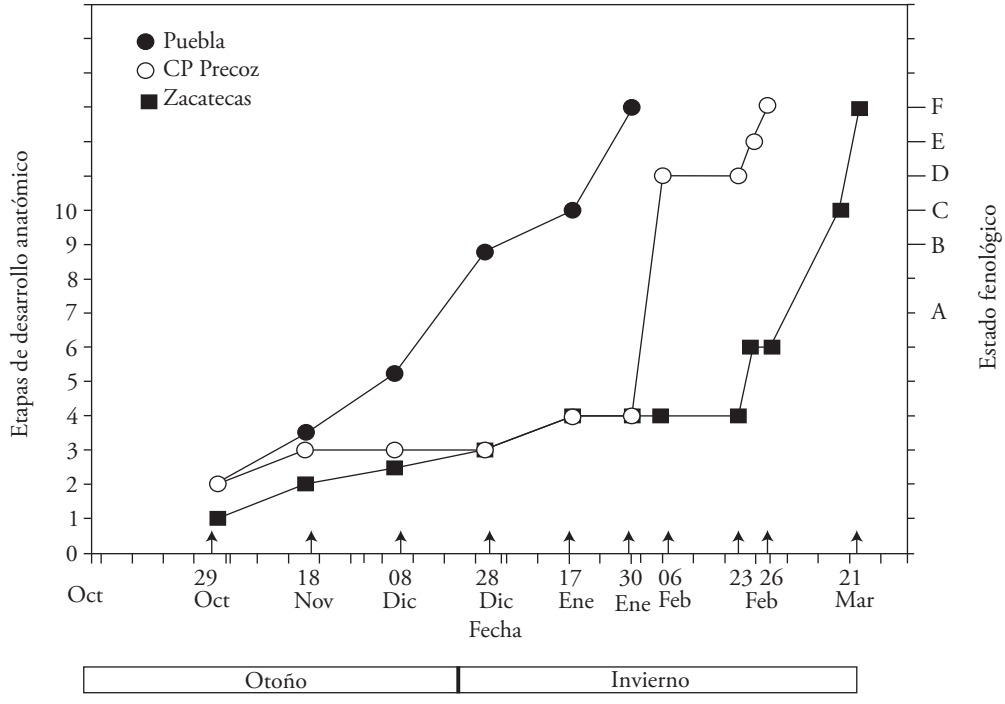

Figura 2. Fenología de la floración de los cultivares Puebla, CP Precoz y Zacatecas desde el reposo (A) hasta 100 % de antesis (F). Las fechas indican fechas de muestreo. Eje Y derecho: estados fenológicos. Eje Y izquierdo: etapas de desarrollo anatómico.

Figure 2. Flowering phenology of the cultivars Puebla, CP Precoz and Zacatecas from dormancy (A) up to 100 % anthesis (F). Arrows indicate sampling dates. Right Y-axis: phenological stages. Left Y axis: stages of anatomical development.

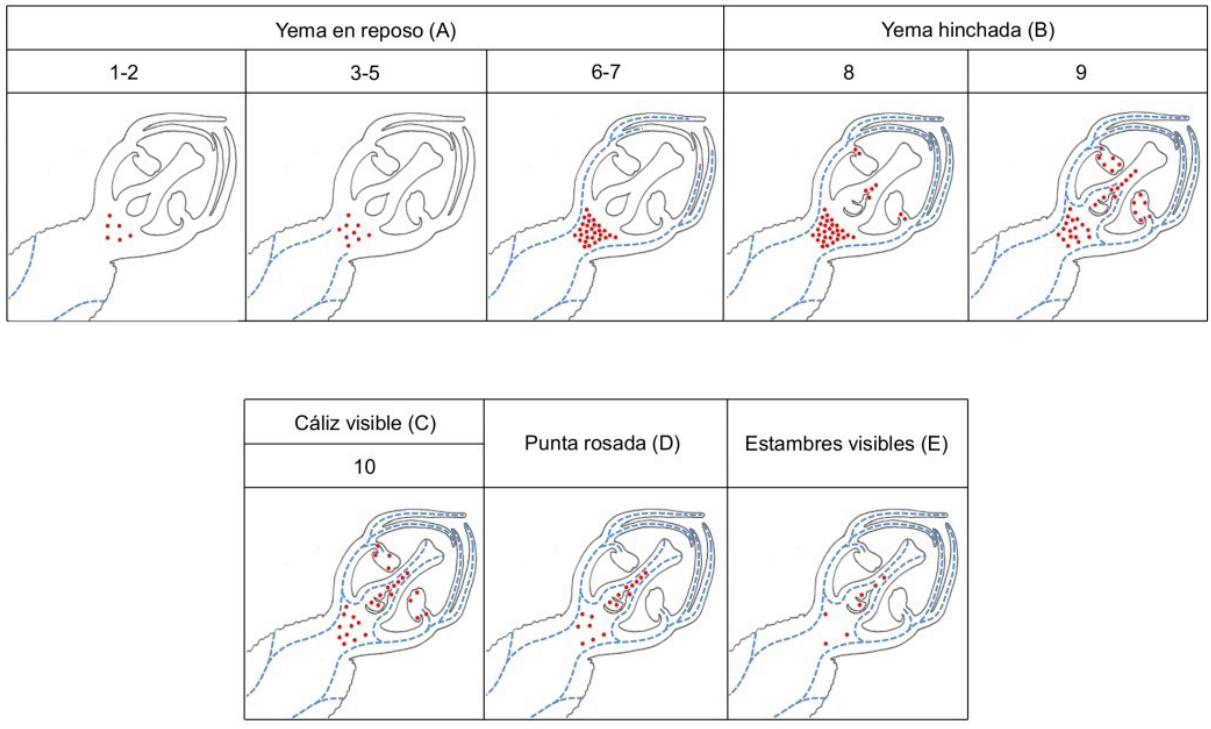

Figura 3. Distribución y abundancia de los granos de almidón y xilema en los verticilos vegetativos y reproductivos de la yema floral en los estados fenológicos: reposo A); yema hinchada B); cáliz visible C); punta rosada D); cáliz visible E). Los puntos rojos indican los granos de almidón y las líneas azules punteadas indican vasos del xilema.

Figure 3. Distribution and abundance of starch grains and xylem in the vegetative and reproductive whorls of the flower bud in the phenological stages: dormant bud A); swollen bud B); visible calyx C); pink tip D); visible calyx E). Red dots indicate starch grains and blue dotted lines indicate xylem vessels.

et al., 2002). Pero nuestro estudio es el primero en describir el avance de la vascularización en las partes de la yema, así como la comparación entre cultivares con diferentes fechas de floración o precocidad.

La vascularización de los verticilos vegetativos, estuvo asociada con un aumento del almidón en el receptáculo (Figura3) en los tres cultivares. Los granos de almidón fueron visibles con epifluorescencia (Figura 4B) y los elementos de vaso del xilema presentaron engrosamiento y placas de perforación escalariformes (Figura 4C). Según Ashworth (1984), en chabacano la conexión vascular entre la ramilla y toda la yema ocurre al final del reposo. En contraste, en los cv. Mexicanos de duraznero este evento fue gradual como se muestra en la Figura 3: el xilema aparece primero en el receptáculo (A-5), luego en el cáliz y la corola (A-7), después el xilema se extendió a las anteras en la yema hinchada (B-8), continuó hacia el ovario (B-9) y alcanzó el estilo y el estigma hasta el estado de cáliz visible (C-10).

al., 2002). However, our study is the first to describe the advancement of vascularization in parts of the bud, as well as the comparison between cultivars with different dates of flowering or precociousness.

The vascularization of the vegetative whorls was related to an increase of starch in the receptacle (Figure 3) in all three cultivars. The starch grains were visible with epifluorescence (Figure 4B) and the elements of the xylem vessel presented thickening and scalariform perforation plates (Figure 4C). According to Ashworth (1984), in apricots, the vascular connection between the twig and all the bud occurs at the end of the dormant stage. In contrast, in the Mexican cv. of peach trees, this event was gradual, as shown in Figure 3: the xylem appears first in the receptacle (A-5), then in the calyx and the corolla (A-7), and later the xylem extends to the anthers in the swollen bud (B-8), it continued towards the ovary (B-9) and reached the style and the stigma up to the visible calyx stage (C-10).

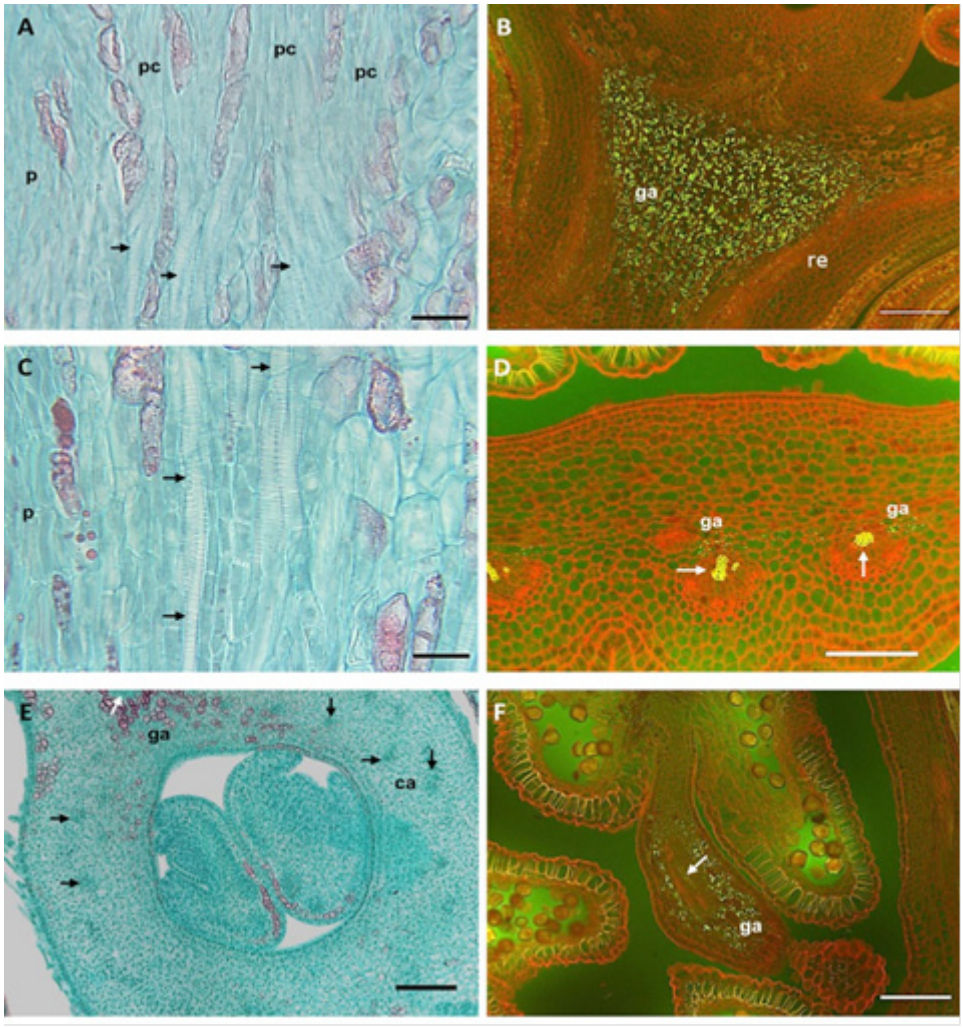

Figura 4. Anatomía de la vascularización y presencia de granos de almidón en yemas florales de duraznero. A) Procambium en el receptáculo, ausencia de xilema en reposo (etapas 3 a 5, cv. Zacatecas); B) granos de almidón en el receptáculo en reposo (etapas 6 a 7, cv. Puebla); C) vasos de xilema en los verticilos vegetativos de yema hinchada (etapa 8, cv CP Precoz); D) xilema y almidón en la base de anteras de yema hinchada (etapa 8, CP Precoz); E) xilema en la pared del carpelo, yema cáliz visible (etapa 10, cv. Puebla); F) vasos y granos de almidón en la antera (etapa 10, cv. Puebla). A, C y E) campo claro; B, D y F) epifluorescencia. Las flechas indican haces vasculares (ga: granos de almidón; re: receptáculo; pc: procambium; ca: carpelo). Barras: A y C = 20 μm; B, D y F = 100 μm; E = 500 μm.

Figure 4. Anatomy of the vascularization and presence of starch grains in peach flower buds. A) Procambium in the receptacle, absence of xylem at dormancy (stages 3 to 5, cv. Zacatecas); B) starch grains at the receptacle of dormant bud (stages 6 to 7, cv. Puebla); C) xylem vessels in the vegetative whorls of swollen bud (stage 8, cv CP Precoz); D) xylem and starch in the base of anthers of swollen bud (stage 8, CP Precoz); E) xylem on the carpel wall, visible calyx bud (stage 10, cv. Puebla); F) vessels and starch grains in the anther (stage 10, cv. Puebla). A, C and E) bright field; B, D and F) epifluorescence. Arrows indicate vascular bundles (ga: starch grains; re: receptacle; pc: procambium; ca: carpel). Bars: A and C = 20 μm; B, D and F = 100 μm; E = 500 μm.

Reinoso *et al*. (2002) solo mencionaron la presencia de tejido vascular en todos los verticilos al final del reposo sin incluir los detalles anatómicos y fenológicos. La Figura 4D muestra haces vasculares y granos de almidón en la base de anteras de yema

Reinoso *et al*. (2002) only mentioned the presence of vascular tissue in all the whorls at the end of the dormant stage without including the anatomical and phenological details. Figure 4D shows vascular bundles and starch grains in the base of anthers of

hinchada (B-8). La pared del ovario se vascularizó (B-9) a finales de yema hinchada (Figura 3). Estos eventos sucedieron primero (inicio de enero) en el cv. Puebla, luego el CP Precoz (febrero) y finalmente en el cv. Zacatecas (principios de marzo). En contraste, en chabacano este evento sucedió antes, a finales del reposo (Julian *et al*., 2011). En cáliz visible (C-10) los haces de xilema avanzaron hacia el estilo hasta llegar al estigma (Figura 3). Los filamentos de las anteras presentaron un haz central anficribal). Los haces vasculares fueron de tipo colateral y abundantes en la pared del carpelo (Figura 4 E). La vascularización completa del pistilo (C-10), sucedió primero en el cv. Puebla (mediados de enero), luego en cv. CP Precoz (inicios de febrero) y al final en Zacatecas (mediados de marzo).

El evento más tardío fue la vascularización del óvulo, lo que explica porque el primordio de la semilla es la estructura que requiere protección del frío, por razones reproductivas. Durante el año del experimento las heladas se presentaron cuando las yemas florales se encontraban en reposo (Santiago-Mejía *et al*., 2015), y nuestro estudio evidenció la ausencia de conexión vascular en este estado.

Distribución de granos de almidón

La presencia y distribución de los granos de almidón estuvo asociada con la diferenciación del xilema y desarrollo de los verticilos florales. En el cv. Puebla los granos de almidón aparecieron primero en la base del receptáculo (08 diciembre) y luego aumentaron en número cuando las anteras iniciaron su desarrollo (Figura 4B). En el cv. CP Precoz este evento sucedió hasta el 23 febrero, después el almidón se presentó en la base de las anteras, mientras los granos de polen formaron la célula generativa y la vegetativa (Figura 5G) (Cuadro 1). En yema hinchada (B-8 y B-9) granos de almidón aparecen en el estilo y las anteras; lo cual coincidió con la diferenciación del xilema en el ovario, el inicio de la nucela, y la formación de la pared del polen (Cuadro 1 y Figura 5I). La diferenciación de xilema en los estambres y durante la formación de los granos de polen en los cv. Puebla y CP Precoz fue similar a lo observado en *P. armeniaca*, aunque la presencia del almidón en las células intermedias ocurrió antes de la formación de microsporas (Julian *et al*., 2011).

swollen buds (B-8). The ovary wall was vascularized (B-9) towards the end of the swollen bud (Figure 3). These events took place first (early January) in cv. Puebla, then in CP Precoz (February), and finally, in cv. Zacatecas (early March). In contrast, in apricot this took place before, at the end of the stage of dormancy (Julian *et al*., 2011). In the visible calyx stage (C-10) the xylem bundles moved to the style until they reached the stigma (Figure 3). The filaments of the anthers presented a central amphicribral bundle. The vascular bundles were collateral and abundant in the carpel walls (Figure 4 E). The complete vascularization of the pistil (C-10) first took place in cv. Puebla (mid-January), then in cv. CP Precoz (early February), and finally, in Zacatecas (mid-March).

The latest event was the vascularization of the ovule, which explains why the primordium of the seed is the structure that requires protection from low temperatures, for reproductive reasons. During the year of the experiment, frosts took place when the flower buds were dormant (Santiago-Mejía *et al*., 2015) and our study showed the absence of vascular connections in this stage.

Distribution of starch grains

The presence and distribution of the starch grains was related to the differentiation of the xylem and development of the floral whorls. In cv. Puebla, the starch grains first appeared at the base of the receptacle (December 08th) and then they increased in number when the anthers began developing (Figure 4B). In cv. CP Precoz, this event took place on February 23rd, and later the starch appeared on the base of the anthers, while the pollen grains formed the generative and vegetative cell (Figure 5G) (Table 1). In swollen bud (B-8 and B-9), starch grains appears in the style and the anthers; which coincided with the differentiation of the xylem in the ovary, the beginning of the nucellus and the formation of the pollen wall (Table 1, Figure 5I). The xylem differentiation at the stamens and during the formation of the polen grains in cv. Puebla and CP Precoz was similar to observations in *P. armeniaca*, although the presence of starch in the intermediate cells occurred before the formation of microspores (Julian *et al*., 2011).

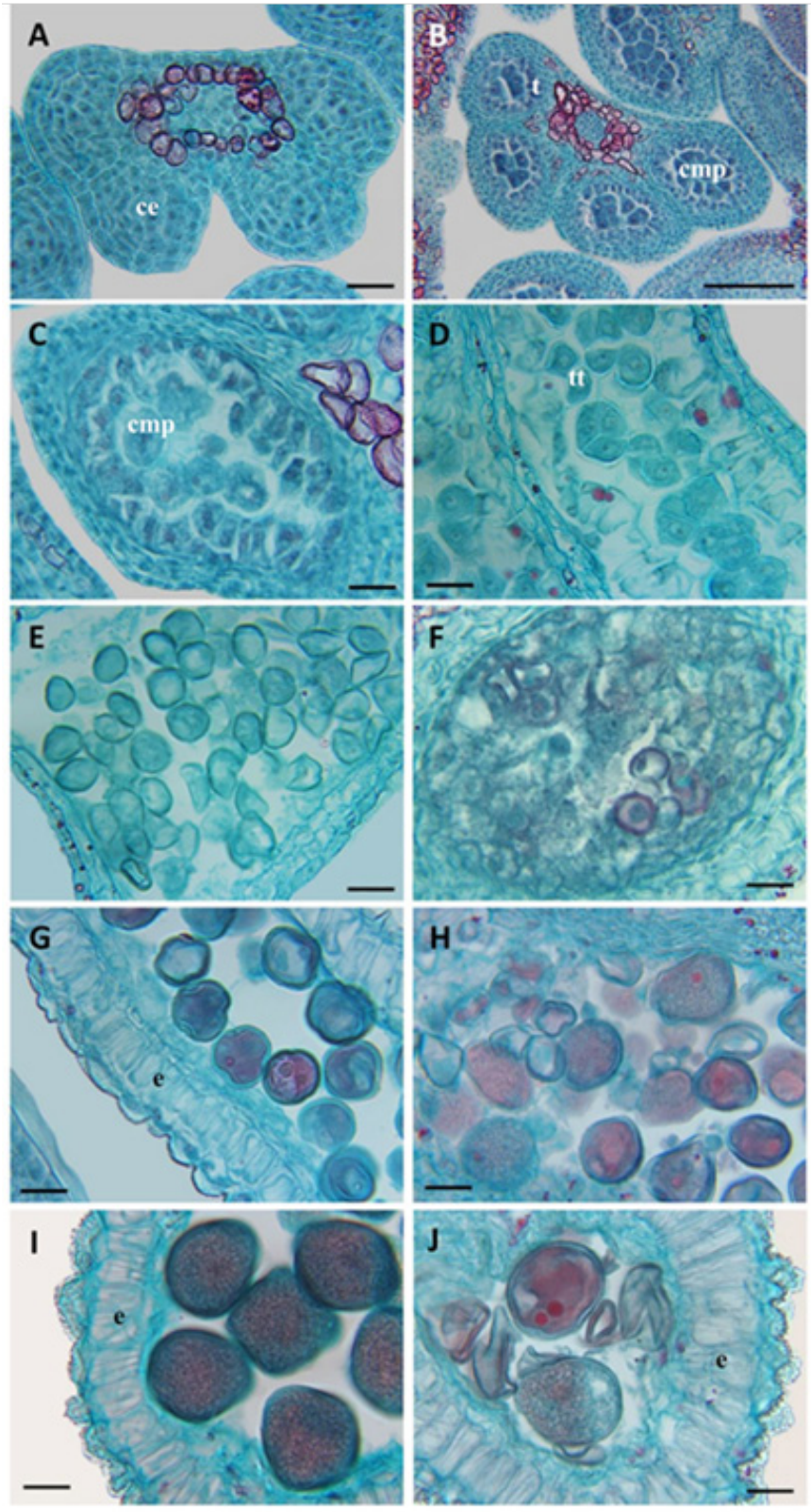

Figura 5. **Desarrollo de la antera en tres cultivares de *Prunus persica*. A) Antera tetraesporangiada con células esporógenas (2n) cv. Puebla; B) células madres del polen (CMP) y tapete diferenciado cv. CP Precoz; C) meiosis de las células madres del polen (1n) Zacatecas; D) formación de tétradas con arreglo tetraédrico cv. Puebla; E) liberación de las microsporas (1n) cv. CP Precoz; F) defecto en la liberación de las microsporas y aborto cv. Zacatecas; G) alargamiento del endotecio y primera mitosis del grano de polen cv. Puebla; H) aborto de granos de polen cv. Zacatecas; I) engrosamiento del endotecio y de la pared del polen cv. Puebla; J) colapso de granos de polen, falta de engrosamiento de la pared del polen cv. Zacatecas. ce: células esporógenas; e: endotecio; cmp: células madres de polen; tt: tétradas. Barras: A, C-J = 20 μm, B = 100 μm.**

Figure 5. **Development of the anther in three *Prunus persica* cultivars A) Tetrasporangiated anther with sporogenous cells (2n) cv. Puebla; B) pollen mother cells (PMC) and differentiated tapetum cv. CP Precoz; C) meiosis of the pollen mother cells (1n) Zacatecas; D) formation of tetrads with a tetrahedral arrangement cv. Puebla; E) release of microspores (1n) cv. CP Precoz; F) defect in the release of microsporas and abortion cv. Zacatecas; G) elongation of the endothecium and first mitosis of the pollen grain cv. Puebla; H) abortion of pollen grains cv. Zacatecas; I) thickening of the endothecium and the pollen wall cv. Puebla; J) collapsing of pollen grains, lack of thickening of the pollen wall cv. Zacatecas. ce: sporogenous cells; e: endothecium; cmp: pollen mother cells; tt: tetrades. Bars: A, C-J = 20 μm, B = 100μm.**

Cuadro 1. Caracterización anatómica de los estados fenológicos de las yemas florales de duraznero (*Prunus pérsica*), desde "yema en reposo" (A) hasta "estambres visibles" (E), observados en los cultivares Puebla, CP Precoz y Zacatecas.
Table 1. Anatomical characterization of the phenological stages of the floral peach buds (*Prunus pérsica*), from "dormant bud" (A) to "visible stamens" (E), observed in the cultivars of Puebla, CP Precoz and Zacatecas.

Estado fenológico†	Etapa anatómica¶	Caracterización Anatómica
A: Yema en "reposo"	1	No existe vascularización de la yema (Figura 3 A), presencia de algunos granos de almidón en la base del receptáculo. Anteras jóvenes tretra-esporangiada con dos lóculos en cada uno de los lóbulos unidos por el tejido conectivo (Figura 5A). En el gineceo solo se observa la cavidad locular.
	2	No hay vascularización de la yema. Epidermis diferenciada en la pared del microesporangio y en el interior células esporógenas grandes con citoplasma denso, núcleos grandes y nucléolos prominentes (Figura 5B). Algunos granos de almidón en el receptáculo (Figura 3 A 1-2).
	3	No hay vascularización de la yema, se identifican algunos elementos de vaso en la base del receptáculo, y aumentan los granos de almidón en la base del receptáculo (Figura 3 A 3-5). Estratos identificables del microesporangio, epidermis, endotecio, tres estratos de células parietales, y el tapete. Inicia la diferenciación de las células madre de polen (CMP, 2n) (Figura 5 C).
	4	Presencia de tejido vascular llegando al centro del receptáculo (Figura 3 A 3-5). La pared interna del microesporangio se diferencia en tapete, con células de citoplasma denso que rodean a las CMP en desarrollo. Inicio de protuberancias meristemáticas del óvulo en la cavidad locular.
	5	Tejido vascular en el receptáculo (Figura 3A 3-5). Células del tapete con grandes vacuolas, algunas binucleadas. Las CMP agrandadas comienzan a separarse una de otra.
	6	El tejido vascular se comienza a diferenciar en los verticilos vegetativos, aumentan los granos de almidón en el receptáculo y éste crece arriba del ovario (flor periginia) (Figura 3 C), En el ovario se diferencia el obturador sobre cada óvulo (sólo 'Puebla'). Meiosis asincrónica, algunas CMP inician la meiosis (Figura 5 C), pero en otras anteras las CMP forman tétradas (1n) (Figura 5 D).
	7	El tejido vascular avanza hacia los verticilos de cáliz y corola (Figura 3 A 6-7). Las microsporas (1n) recién se liberan de las tétradas (Figura 5 E). El tapete degenera gradualmente, las células parietales comienzan a comprimir al endotecio.
B: Yema hinchada	8	Los granos de almidón aparecen en la base de las anteras y el tejido vascular se extiende a las anteras (Figura 4 F) y aparece almidón cerca del óvulo (Figura 3 B 8). Expansión de las células del endotecio y granos de polen en mitosis (Fig. 5 G), una célula generativa y una célula vegetativa. Se observan nucela del óvulo y obturador en CP Precoz y Zacatecas.
	9	Aumentan los granos de almidón en el pistilo y anteras, pero disminuyen en la base del receptáculo (Figura 3 B-9). La vascularización abarca el ovario (Figura 3 E). La nucela de los óvulos es prominente. Estratos intermedios de la antera comprimidos y los granos de polen forman una exina gruesa (Figura 5 I).
C: Cáliz visible	10	Los granos de almidón disminuyen en toda la yema, pero su vascularización es completa, el xilema avanza hasta el estigma (Figura 3 C-10). En el ovario, los óvulos continúan su desarrollo. La pared del endotecio desarrolla bandas de engrosamiento de pared secundaria en la parte anticlinal y tangencial. En el estigma se inicia la diferenciación de una epidermis con papilas secretoras.
D: Punta Rosada		Granos de almidón ausente en las anteras y persistente en el pistilo (Figura 3 D). Grano de polen maduro. El ovulo continua su desarrollo. La corola se observa como un círculo rosa pequeño en el ápice de la yema (Figura 1 Punta rosada), los sépalos adquirieren su color verde-marrón. Adelgazamiento en el estomio.
E: Estambres visibles		Granos de almidón muy escasos en el pistilo y base del receptáculo (Figura 3 E). Los pétalos duplican su longitud, las flores jóvenes se abren parcialmente, los estambres se hacen visibles hacia el exterior de la flor (Figura 1 E), el estomio se rompe. El estigma ha desarrollado una cubierta con papilas secretoras.

No se incluye el estado fenológico de antesis por no presentar cambios anatómicos relevantes para este estudio.
† La nomenclatura usada de los estados fenológicos es según Baggliolini (1952).
¶ La nomenclatura usada de las etapas anatómicas es según Reinoso *et al*. (2002).

En el estado de cáliz visible (C-10), de los tres cultivares, hubo disminución de los granos de almidón en la base de la yema y aumento en el pistilo, evento coordinado con la diferenciación del xilema en el estilo. Sin embargo, en punta rosada (D), el almidón desapareció de las anteras, aunque persistió en el ovario (Figura 4). Este patrón fue similar al observado en inflorescencias de olivo (De la Rosa y Rallo, 2000). Los cambios en la partición de almidón durante el desarrollo de las yemas florales se han demostrado en *Prunus persica* (Bonhomme *et al*., 2005; González-Rossia *et al*., 2008), *Rubus idaeus* (Palonen, 1999), *Pyrus pyrifolia* (Ito *et al*., 2002), *Populus* x *canadensis* (Elle y Sauter, 2000) y *Olea europea* (De la Rosa y Rallo, 2000), pero nuestro reporte es el primero sobre la localización histológica del almidón en la yema floral asociada con la morfogénesis y diferenciación del xilema en duraznero.

Caracterización anatómica con énfasis en desarrollo de antera

Los cambios anatómicos observados en la yema en el estado fenológico de reposo (A) se agruparon en siete etapas anatómicas (1-7) las cuales se resumen en el Cuadro 1. Estos eventos sucedieron de manera desfasada en el tiempo entre cultivares (Figura 2). Los cambios anatómicos observados durante las primeras cuatro etapas anatómicas del reposo (A-1 a A-4), sucedieron lentamente en la yema floral del cv Zacatecas (4 meses), fueron menos lentos en el cv. CP Precoz (3 meses) y rápidos en el cv. Puebla en 20 d (Figura 2 y Cuadro 1).

En los tres cultivares, durante el "reposo" (A), el desarrollo temprano del polen, fue normal y similar; el microesporangio presentó células esporógenas (2n) (Cuadro 1 y Figura 5A); en la etapa A-2 se diferenciaron las células madres de polen (2n) (Cuadro 1); en las etapas A-3 y A-4 el tapete fue prominente (Cuadro 1 y Figura 5C); en la etapa A-6 se observaron las células madres del polen (CMP) en meiosis y las microesporas (1n) se organizaron en un arreglo tetraédrico (Figura 5D). En yema hinchada (B8 y B-9), del cv Puebla y CP Precoz, las microsporas se separaron en granos de polen jóvenes (1n) (Cuadro 1 y Figura 5E), pero en el cv. Zacatecas las microsporas no se separaron, y algunas se obliteraron y desintegraron (Figura 5F). Esto significó un defecto en la formación del grano de polen en el cv. Zacatecas. Después,

In the visible calyx stage (C-10), of the three cultivars, there was a reduction of starch grains in the base of the bud and an increase in the pistil, in coordination with the differentiation of the xylem in the style. However, in pink tip (D), the starch disappeared from the anthers, although it persisted in the ovary (Figure 4). This pattern was similar to the one observed in olive inflorescences (De la Rosa and Rallo, 2000). The changes in the partition of starch during the development of the floral buds have been shown in *Prunus persica* (Bonhomme *et al*., 2005; González-Rossia *et al*., 2008), *Rubus idaeus* (Palonen, 1999), *Pyrus pyrifolia* (Ito *et al*., 2002), *Populus* x *canadensis* (Elle and Sauter, 2000) and *Olea europea* (De la Rosa and Rallo, 2000), although our report is the first on the histological location of starch in the flower bud related to the morphogenesis and differentiation of the xylem in peach.

Anatomic characterization with emphasis on anther development

The anatomical changes observed in the bud in the phonological stage of dormancy (A) were grouped into seven anatomical stages (1-7), which are shown in Table 1. These events took place with differences in time between cultivars (Figure 2). The anatomical changes observed during the first four stages of dormancy (A-1 to A-4), occurred slowly in the flower bud of the cv Zacatecas (4 months), less slowly in cv. CP Precoz (3 months), and fast in cv. Puebla in 20 d (Figure 2 and Table 1).

In the three cultivars, during the "dormancy" (A), the early development of the pollen was normal and similar; the microsporangia presented sporogenous cells (2n) (Table 1 and Figure 5A); in stage A-2 the pollen mother cells (2n) were differentiated (Table 1); in stages A-3 and A-4 the tapetum was prominent (Table 1 and Figure 5C); in stage A-6 the pollen mother cells (PMC) were observed in meiosis and the microspores (1n) were organized in a tetrahedral arrangement (Figure 5D). In swollen bud (B8 and B-9), of the cv Puebla and CP Precoz, the microspores were separated into young pollen grains (1n) (Table 1 and Figure 5E), although in cv. Zacatecas, the microspores did not separate, and some were obliterated and disintegrated (Figure 5F). This meant a defect in the formation of the pollen grain in cv. Zacatecas. Later, cv Puebla and

los cv Puebla y CP Precoz continuaron su desarrollo normal, aunque desfasado en el tiempo; el cv Puebla presentó primero la primera mitosis del grano de polen joven y el engrosamiento de la pared del polen (Figura 5G), y el cv. Zacatecas mostró granos de polen obliterados con deficiente engrosamiento de la exina (Figura 5H).

En el siguiente estado, cáliz visible (10-C), las paredes anticlinales del endotecio se lignificaron de manera normal en los tres cultivares, pero la maduración del grano de polen solo se presentó en los cv. Puebla y CP Precoz (Figura 5I).

En el estado de punta rosada (D) varias microsporas detuvieron su desarrollo y abortaron en el cv. Zacatecas (Figura 5H). El cv. Zacatecas presentó la mayoría de los granos de polen abortivos y con defectos en la exina (Figura 5J).

Las anormalidades y aborto del polen se han observado cuando los requerimientos de frío son insatisfechos (Bonhomme *et al.*, 2005; Nava *et al.*, 2009; Reig *et al.*, 2013). En el contexto del calentamiento global los frutales de clima templado enfrentarán reducción en horas frío, problemas durante el "reposo" asociados con aborto y reducción en el flujo de carbohidratos hacia las yemas (Campoy *et al.*, 2011; Marafon *et al.*, 2011). De acuerdo con el método de Richardson *et al.* (1974), el cv. Zacatecas requiere 550 Unidades Frío (UF), el CP Precoz 400 UF y el Puebla 350 UF (Santiago-Mejía *et al.*, 2015). El frío acumulado promedio del 17 noviembre al 31 de marzo en la región de estudio, fue menor a las 550 UF (Santiago-Mejía *et al.*, 2015). En forma natural el cv. Zacatecas se encuentra a mayor latitud y acumula más horas frío (Rumayor *et al.*, 2009). La deficiencia de frío provoca anomalías en el gametofito masculino como; aborto de polen, reducción de la producción y problemas de germinación del polen (Nava *et al.*, 2009), además de una apertura floral anormal (Bonhomme *et al.*, 2005). Lo anterior explica las anomalías observadas en el desarrollo del polen de Zacatecas.

CONCLUSIONES

La diferenciación del xilema, en la yema floral del duraznero es acrópeta (la maduración de los elementos de vaso inicia en la base y avanza hacia la punta de la yema) y gradual. No hay indicios de vascularización durante el reposo temprano en los tres cultivares

CP Precoz continued developing normally, although with differences in time; cv Puebla was the first to present the mitosis of the young pollen grain and the thickening of the pollen wall (Figure 5G), and cv. Zacatecas displayed obliterated pollen grains with a deficient thickening of the exine (Figure 5H).

In the following stage, visible calyx (10-C), the anticlinal walls of the endothecium were normally lignified in the three cultivars, although the maturation of the pollen grain only appeared in cv. Puebla and CP Precoz (Figure 5I).

In the pink tip stage (D), several microspores stopped developing and aborted in cv. Zacatecas (Figure 5H). The cv. Zacatecas presented the majority of abortive pollen grains with defects in the exine (Figure 5J).

Pollen abnormalities and abortions have been observed when the requirements of chilling have not been met (Bonhomme *et al.*, 2005; Nava *et al.*, 2009; Reig *et al.*, 2013). In the context of global warming, temperate fruit trees of will face reduction in chilling hours, problems during "dormancy" related to abortion and reduction in the flow of carbohydrates towards the buds (Campoy *et al.*, 2011; Marafon *et al.*, 2011). According to the method by Richardson *et al.* (1974), cv. Zacatecas requires 550 Chill Units (CU), CP Precoz requires 400 CU, and Puebla, 350 CU (Santiago-Mejía *et al.*, 2015). The average chilling accumulated between November 17th and March 31st in the area under study was below 550 CU (Santiago-Mejía *et al.*, 2015). In Natural conditions cv. Zacatecas is at higher latitude and accumulate more chilling hours (Rumayor *et al.*, 2009). The chilling deficiency causes anomalies in the male gametophyte, such as; the abortion of pollen, reduction in the polen production and germination problems (Nava *et al.*, 2009), as well as an abnormal floral opening (Bonhomme *et al.*, 2005). This explains the anomalies observed in the development of pollen in Zacatecas.

CONCLUSIONS

The differentiation of the xylem in the peach flower bud is acropetal (the maturation of the vessel elements begins at the base and moves towards the tip of the bud) and gradual. There are no signs of vascularization during the early dormancy in the three cultivars under study (Puebla, CP Precóz and

estudiados (Puebla, CP Precóz y Zacatecas). La presencia de almidón precedió a la aparición de xilema. La vascularización de los verticilos vegetativos inició en el reposo tardío: a los dos meses en el cv. Puebla, a los tres meses en el cv. CP Precoz y a los cuatro meses y medio en el cv. Zacatecas. La vascularización avanza hasta el ovario en el estado de yema hinchada y continúa hacia el estigma hasta cáliz visible. La vascularización del estilo fue el evento que presentó la mayor variación entre cultivares: en el cv. Puebla15 días, en CP Precoz 27 días, y en el cv. Zacatecas 4 días. La vascularización fue postergada de acuerdo con la precocidad del cultivar. La vascularización tardía de la parte femenina, sería una estrategia para proteger su función reproductiva en presencia de heladas. Esta información se puede usar en programas de manejo agronómico y reducir los daños por heladas en durazno.

Zacatecas). The presence of starch preceded the appearance of the xylem. The vascularization of the vegetative whorls began at the late dormancy: after two months for cv. Puebla, after three months for cv. CP Precoz, and after four and a half months for cv. Zacatecas. Vascularization moves up to the ovary in the swollen bud, and continues towards the stigma until calyx was visible. The vascularization of the style was the event that presented the greatest variation between cultivars: in cv. Puebla, 15 days; in CP Precoz,27 days; and in cv. Zacatecas, 4 days. Vascularization was postponed according with the precociousness of the cultivar. Late vascularization of the female, part would be a strategy to protect its reproductive function in the presence of frost. This information can be used in programs of agronomic management and reduce damages caused by frost in peach trees.

—End of the English version—

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de doctorado (No. 103525) otorgada al primer autor. Agradecemos al M.C. Jorge Manuel Valdés Carrazco por su asesoría en la ilustración.

LITERATURA CITADA

Andreini, L., I. García de Cortázar-Atauri, I. Chuine, R. Viti, S. Bartolini, D. Ruiz, J.A. Campoy, J. M. Legave, J. Audergon, and P. Bertuzzi. 2014. Understanding dormancy release in apricot flower buds (*Prunus armeniaca* L.) using several process-based phenological models. Agric. Forest Meteorol. 184: 210-219.

Arora, R., and M. Wisniewski. 1994. Cold acclimation in genetically related (sibling) deciduous and evergreen peach, *Prunus persica*. II. A 60-kilodalton bark protein in cold acclimated tissues of peach is heat-stable and related to the dehydrin family of proteins. Plant Physiol. 105: 95-101.

Ashworth, E. N. 1982. Properties of peach flower buds which facilitate supercooling. Plant Physiol. 70: 1475-1479.

Ashworth, E. N. 1984. Xylem development in *Prunus* flower buds and the relationship to deep supercooling. Plant Physiol. 74: 862-865.

Baggiolini M., 1952. Les stades repères de l'abricotier. Revue romande d'Agriculture et d'Arboriculture 8: 28-30

Baker, J. R. 1966. Cytological Technique. The Principles Underlying Routine Methods. 5th Edition. London, Mehuen & Co. 321p.

Campoy, J. A., D. Ruiz, and J. Egea. 2011. Dormancy in temperate fruit trees in a global warming context: A review. Sci. Hort. 130:3 57-372.

Cortés, F., J. I., A. Turrent F., P. Díaz V., E. Hernández R., R. Mendoza R., y E. Aceves. 2005. Manual para el establecimiento y manejo del sistema milpa intercalada con árboles frutales (MIAF) en laderas. (SAGARPA, Ed.) México: Colegio de Postgraduados. <sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasCOUSSA/03%20MILPA%20INTERCALADA%20CON%20FRUTALES.pdf> (Consulta: abril 2014).

De la Rosa, R., and L. Rallo. 2000. Olive floral bud growth and starch content during winter rest and spring budbreak. HortScience. 35: 1223-1227.

Die, J. and L. Rowland. 2014. Elucidating cold acclimation pathway in blueberry by transcriptome profiling. Environ. Exper. Bot. 106: 87-98.

Elle, D., and J. Sauter. 2000. Seasonal changes of activity of a starch granule bound endoamylase and a starch phosphorylase in poplar wood (*Populus* x *canadensis* Moench "robusta") and their possible regulation by temperature and phytohormones. J. Plant Physiol. 156:731-740.

García, E. M. 1987. Modificación al Sistema Climático de Köppen. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 217 p.

González-Rossia, D., C. Reig, V. Dovis, N. Gariglio, and M. Agustí. 2008. Changes on carbohydrates and nitrogen content in the bark tissues induced by artificial chilling and its relationship with dormancy bud break in *Prunus* sp. Sci. Hort. 118: 275-281.

Govaerts, B., M. G. Barrera-Franco, A. Limón-Ortega, P. Muñoz-Jiménez, D .K. Sayre, y J. Deckers. 2008. Clasificación y evaluación edafológica de tres sitios experimentales del altiplano central de México. Tropicultura 26: 2-9.

Horvath, D. 2009. Common mechanisms regulate flowering and dormancy. Plant Sci. 177: 523-531.

Ito, A., H. Hayama, and Y. Kashimura. 2002. Sugar metabolism in buds during flower bud formation: a comparison of two Japanese pears [*Pyrus pyrifolia* (Burm) Nak.] varieties possessing different flowering habits. Sci. Hort. 96: 163-175.

Julian, C., J. Rodrigo, and M. Herrero. 2011. Stamen development and winter dormancy in apricot (*Prunus armeniaca*). Ann. Botany. 108: 617-625.

Julian, C., M. Herrero, and J. Rodrigo. 2014. Anther meiosis time is related to winter cold temperatures in apricot (*Prunus armeniaca* L.). Environ. Exper. Bot. 100: 20-25.

Luna, V., E. Lorenzo, H. Reinoso, M. Tordable, G. Abdala, R. Pharis, and R. Bottini. 1990. Dormancy in peach (*Prunus persica* L.) flower buds I. Floral morphogenesis and endogenous gibberellins at the end of the dormancy period. Plant Physiol. 93: 20-25.

Marafon, A., C. I. Citadir, L. Amarante, F. G. Herter, F. J. Hawerroth. 2011. Chilling privation during dormancy period and carbohydrate mobilization in Japanese pear trees. Sci. Agri. (Piracicaba, Braz.). 68: 462-468.

Nava, G., G. Dalmago, H. Bergamaschi, R. Paniz, R. dos Santos, and G. Marodin. 2009. Effect of high temperatures in preblooming and blooming periods on ovule formation, pollen grains and yield of ´Granada´ peach. Sci. Hort. 122: 37-44.

Palonen, P. 1999. Relationship of seasonal changes in carbohydrates and cold hardiness in canes and buds of three red raspberry cultivars. J. Am. Soc. Hort. Sci. 124: 507-513.

Reig, G., I. Iglesias, C. Miranda, F. Gatius, and S. Alegre. 2013. How does simulated frost treatment affect peach [*Prunus persica* (L.)] flowers of different varieties from worldwide breeding programmes? Sci. Hort. 160: 70-77.

Reinoso, H., L. Virginia, R. Pharis, and R. Bottini. 2002. Dormancy in peach (*Prunus persica*) flower buds. V. Anatomy of bud development in relation to phenological stage. Can. J. Bot. 80: 656-663.

Richardson, E. A., S. D. Seeley, and D. R. Walker. 1974. A model for estimating the completion of rest for `Redhaven` and `Alberta` peach trees. HortScience. 9: 331-332.

Rumayor, R. A., L. J. Llamas, M. V. Melero, y D. J. Zegbe. 2009. Descripción fenotípica de material genético de durazno para Zacatecas. INIFAP. Publicación especial 16. 26 p.

Santiago-Mejía, H., J. I. Cortés-Flores, A. Turrent-Fernández, M. Livera-Muñoz, E. García-Moya, H. A. Zavaleta-Mancera, y V. H. Volke-Haller. 2015. Respuesta de árboles de duraznero [*Prunus persica* (L.) Batsch] compuesto de dos cultivares en un ambiente con incidencia de heladas: floración y amarre de fruto. Agrociencia. 49: 573-592.

Wisniewski, M., and G. Davis. 1989. Evidence for the involvement of a specific cell wall layer in regulation of deep supercooling of xylem parenchyma. Plant Physiol. 91: 151-156.

Yamane, H., T. Ooka, H. Jotatsu, R. Sasaki, and R. Tao. 2011. Expression analysis of PpDAM5 and PpDAM6 during flower bud development in peach (*Prunus persica*). Sci. Hort. 129: 844-84.