

Evaluación de la tolerancia de las flores de almendro a las heladas por la fluorescencia de clorofila

O. Kodad*, F. Morales** y R. Socias¹*

* Unidad de Fruticultura, CITA de Aragón, Av. Montañana 930, 50059 Zaragoza, España.

** Estación Experimental de Aula Dei, CSIC, Apartado 13034, 50080 Zaragoza, España.

¹ Autor para correspondencia. E-mail: rsocias@aragon.es

Resumen

La mayoría de los cultivares de almendro son susceptibles a las temperaturas negativas, lo que limita su expansión a las zonas con riesgo de heladas primaverales. Por ello casi todos los programas de mejora genética del almendro tienen como objetivo prioritario la selección de genotipos de floración tardía o muy tardía, con el fin de evitar los períodos de alto riesgo de heladas. Los estudios de la tolerancia de las flores y los pequeños frutos a las heladas se han limitado a la observación de los daños morfológicos ocasionados por las bajas temperaturas. Por ello, en este estudio se ha evaluado el uso de la fluorescencia de clorofila (FC) para estimar la tolerancia de 12 cultivares comerciales de distinta procedencia a las bajas temperaturas. Las flores de almendro se sometieron durante 24 horas a distintas temperaturas (0°, -1°, -2° y -3°C), midiendo a continuación la FC. En general, la fluorescencia variable (Fv) y la relación Fv/Fm (donde Fm es la fluorescencia máxima) disminuyeron con el tiempo en todos los genotipos, aunque el ritmo de reducción varió según el genotipo. La reducción de estos parámetros fue más lenta en los cultivares tolerantes a las bajas temperaturas, con una reducción lineal y/o sigmoideal en los cultivares susceptibles. En general, la clasificación de los genotipos según su grado de tolerancia a las heladas mediante esta técnica coincide con las señaladas en la bibliografía. Estos resultados indican que la fluorescencia de clorofila es una técnica prometedora (rápida, cuantitativa, sencilla y no destructiva) para determinar la tolerancia de los genotipos de almendro a las heladas independientemente de su época de floración.

Palabras clave: Almendro, flor, tolerancia, heladas, fluorescencia de la clorofila, mejora.

Summary

Evaluation of almond flower tolerance to frosts by chlorophyll fluorescence

Most almond cultivars are susceptible to negative temperatures, a limiting factor for almond expansion to regions with risks of spring frosts. As a consequence, the main objective of most almond breeding programmes is to select late- or very late-blooming genotypes, in order to avoid the periods of high frost risk. Flower and fruitlet tolerance to frosts has been only studied so far by observing the morphological damages produced by low temperatures. Thus, our objective was the evaluation of chlorophyll fluorescence (FC) to estimate the tolerance of 12 commercial almond cultivars from different origin to low temperatures. Flowers were maintained during 24 hours at different temperatures (0°, -1°, -2° and -3°C), measuring FC afterwards. In general, the variable fluorescence (Fv) and the ratio Fv/Fm (being Fm the maximal fluorescence) decreased with time in all genotypes, although the decreasing rate depended on the genotype. The decrease of these parameters was slower in the cultivars tolerant to low temperatures, whereas the decrease was linear or/and sigmoid in the susceptible cultivars. In general, the classification of genotypes according to their frost tolerance level with this technique agreed with the published references. These results lay out that chlorophyll fluorescence is a promising technique (fast, quantitative, easy and non-destructive) to ascertain the tolerance of almond genotypes to frosts independently of their blooming time.

Key words: Almond, flower, tolerance, frosts, chlorophyll fluorescence, breeding.

Introducción

En la naturaleza, se entiende por estrés provocado por heladas el debido a la incidencia de temperaturas inferiores a 0°C (Sakai y Laracher, 1987). Sus daños provocan un desorden fisiológico de distinta magnitud en diferentes partes de la planta (Walker *et al.*, 1990). Desde el punto de vista agronómico, se define a la helada como el descenso térmico capaz de causar algún daño, e incluso la muerte, a los tejidos vegetales independientemente de la aparición de hielo exterior. La producción española de almendra muestra unas grandes oscilaciones, debidas sobre todo a la ocurrencia de heladas en la época de floración o en los primeros estados de crecimiento del fruto (Tabla 1). La baja producción registrada en el año 2004 se debió principalmente a la ocurrencia de varias heladas en el mes de marzo (Kodad y Socias i Company, 2005).

Grasselly y Crossa-Raynaud (1980) mencionaron los estudios llevados a cabo por Evreinnoff (1952) en relación a la resistencia de las

yemas de almendro a las heladas, coincidiendo en considerar que las flores son sensibles a -3°C en el estado fenológico D (Felipe, 1977), a -1,5°C en el momento de floración y helándose los frutitos recién cuajados a -0,5°C. Büyükyilmaz y Kester (1976) mencionaron que el grado de los daños causados por las heladas depende de la fase del desarrollo de la flor y de la edad de la planta. Snyder y Connell (1995) concluyeron que "Nonpareil" y "Sonora", en un conjunto de 9 cultivares americanos, son los más resistentes a las heladas en el estado fenológico D. Desde el punto de vista genético, no se ha cuantificado la transmisión de la tolerancia a las heladas, aunque se cree que esta bajo control poligénico y que se transmite de forma cuantitativa (Felipe, 1988). La mayoría de los estudios se han limitado a la descripción morfológica de los daños causados por las heladas en las yemas y las flores del almendro (Büyükyilmaz y Kester, 1976) o a evaluar la magnitud de los daños causado por las heladas en función de las pérdidas en la producción (Felipe, 1988).

Tabla 1. Producción de almendra en pepita (tm) en las principales regiones productoras de España durante los últimos 10 años (CAP)
Table 1. Almond kernel production (tm) in the main Spanish producing regions during the last 10 years (CAP)

Región	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Andalucía	9.532	7.300	10.500	7.350	2.100	12.000	14.600	7.300	5.440	11.850
Murcia	7.987	8.900	11.300	8.000	2.000	8.300	11.500	6.900	6.289	11.202
Valencia	7.679	8.000	11.200	4.500	1.600	6.400	8.900	6.010	4.450	8.000
Aragón	5.402	6.600	6.700	3.600	800	5.000	6.700	5.700	5.116	10.280
Cataluña	4.793	3.600	5.100	3.460	1.400	3.693	5.000	3.413	3.071	7.102
Castilla-La Mancha	1.466	3.600	5.000	1.680	1.284	3.245	4.500	1.700	3.206	8.136
Baleares	1.277	1.400	1.800	570	2.450	2.100	2.000	2.500	2.200	880
Otras	651	700	1.050	500	500	833	720	605	898	1.556
Total	38.787	40.100	52.650	29.660	12.134	41.571	54.100	34.128	30.670	59.006

Aunque hace tiempo que se conoce que cualquier cambio en la emisión de fluorescencia por la clorofila en los órganos fotosintéticos es una indicación de cambios en su actividad fotosintética (McAlister y Meyers, 1940), recientemente se ha comprobado la validez de las medidas de fluorescencia de la clorofila para estimar la eficiencia en el transporte de los electrones por el PSII (fotosistema II) en la hoja (Genty *et al.*, 1989). La eficiencia del PSII se ha relacionado con la eficiencia de asimilación del CO₂ (Genty *et al.*, 1989), por lo que esta técnica permite examinar la eficacia fotosintética en hojas en condiciones controladas y en condiciones de campo (Baker y Rosenqvist, 2004). La relación entre la eficiencia del PSII y la asimilación del CO₂ en la hoja permite detectar las diferencias en la respuesta de las plantas a las condiciones ambientales adversas y por consiguiente seleccionar para la tolerancia frente a estas condiciones (Baker, 1996). El metabolismo de las hojas se inhibe severamente como consecuencia de la destrucción o la desregulación del PSII por las heladas (Tijksens *et al.*, 1994), lo que resulta en un cambio en la emisión de fluorescencia por la clorofila. Por ello, la estimación de la fluorescencia por la clorofila en estas condiciones permite seleccionar para la tolerancia a las heladas (Smillie y Hetherington, 1990) o para establecer un orden de las especies en función de su tolerancia a las heladas (Greaves y Wilson, 1986).

Recientemente se ha avanzado en el uso práctico de las medidas de fluorescencia de la clorofila, que se ha mostrado eficaz para evaluar la tolerancia a las heladas en tomate (Walker *et al.*, 1990), pimienta verde, patata (Greaves y Wilson, 1987), fresa (Khanizadeh y DeEll, 2001) y plantas ornamentales (Hakam *et al.*, 2000). La reducción de la emisión de fluorescencia por la clorofila fue significativa en hojas y/o en flores después de estar expuestas a bajas temperaturas

(Karukstis, 1991). En general, las plantas susceptibles y tolerantes exhiben el mismo patrón de reducción de emisión de fluorescencia de la clorofila, pero en las plantas sensibles la reducción tiene lugar a un ritmo más acelerado (Bernnan y Jefferies, 1990; Hakam *et al.*, 2000).

El objetivo principal de este trabajo fue comprobar la posibilidad de utilizar la fluorescencia de la clorofila como técnica rápida para determinar la tolerancia de las flores del almendro a las heladas y su posible uso a gran escala en los programas de mejora para la selección de genotipos tolerantes a las heladas.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se estudiaron un total de 12 cultivares comerciales de almendro procedentes del banco de germoplasma del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Zaragoza (Tabla 2), algunos de ellos citados en la bibliografía como tolerantes a las heladas, como "Masbovera", "Mission", "Nonpareil" y "Peerless". Estos cultivares se encuentran plantados en bloques de tres árboles por clon en un suelo de tipo aluvial y de textura franca.

Daños causados por bajas temperaturas

Con el objetivo de evaluar el efecto de las heladas en condiciones controladas, en la época de floración se recogieron de 20 a 30 flores en el estado fenológico E, se colocaron en bolsas de plástico de polietileno humidificadas y se llevaron al laboratorio. Inmediatamente se colocaron en una incubadora frigorífica (Cooled Incubator, Binder ATP.Line KB, Tuttlingen, Alemania). Las tem-

Tabla 2. Porcentaje de daños observados en pistilos después de los tratamientos en condiciones controladas y clasificación de los cultivares en relación a las heladas
Table 2. Percentage of damages observed in pistils after treatment in controlled conditions and cultivar classification in relation to frosts

Cultivar	T1 (-1°)	T2 (-2,5°)	Tolerancia a la helada
Moncayo	26 a	46 b	Susceptible
Tuono	19 b	57 a	Muy susceptible
Perrless	19 b	41 c	Susceptible
Felisia	18 bc	52 a	Muy susceptible
Guara	16 bc	28 d	Tolerante a Susceptible
Mission	16 bc	32 d	Tolerante a Susceptible
Ferragnès	15 bc	39 c	Susceptible
D. Largueta	12 c	54 a	Muy susceptible
Nonpareil	12 c	28 d	Tolerante a Susceptible
Marcona	9 d	26 d	Tolerante a Susceptible
Bertina	9 d	24 de	Tolerante
Masbovera	8 d	21 e	Tolerante

Valores con letras distintas son significativamente diferentes por el test LSD a $P = 0,05$.

peraturas de ensayo se eligieron entre -1°C y $-2,5^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora, de acuerdo con las referencias de estudios sobre el efecto de las heladas según cada estado fenológico (Proebsting y Mills, 1978). La temperatura inicial en la incubadora fue $+4^{\circ}\text{C}$ y disminuyó a un ritmo de 2°C por hora hasta la temperatura deseada. Después del período de incubación se subió a un ritmo de 2°C por hora hasta 5°C . Las muestras se guardaron después en un frigorífico a 4°C durante 24 horas para su observación y la estimación de los daños en los pistilos.

En relación a la magnitud de los daños observados en los dos tratamientos, especialmente a $-2,5^{\circ}\text{C}$, se estableció una clasificación subjetiva de la tolerancia a las heladas de las selecciones estudiadas: muy susceptible cuando los daños superaron el 50% de las yemas de flor observadas; susceptible, con daños entre el 31% y 50%; de tolerante a susceptible, con

daños entre el 25% y 30%; y tolerante, con daños inferiores al 24%.

Evaluación mediante fluorescencia de la clorofila (FC)

Se aplicó, con algunas adaptaciones, el procedimiento descrito por Khanizadeh y DeEll (2001). Se marcaron varios ramos homogéneos y aproximadamente a la misma altura del suelo para disminuir el efecto del estado nutritivo de las muestras sobre la fluorescencia de la clorofila (Baker y Rosenqvist, 2004). Para evitar el efecto de la edad de la muestra sobre la FC, se cogieron al azar muestras de 20 yemas de flor en estado fenológico E. Las muestras se colocaron inmediatamente en la incubadora a una temperatura inicial de $+4^{\circ}\text{C}$, programada para efectuar una disminución de temperaturas de 1°C por hora. Las yemas se sometieron a 4

tratamientos: 0°C, -1°C, -2°C y finalmente -3°C durante 24 horas para cada tratamiento.

Las medidas de la fluorescencia se hicieron bajo luz verde de 40W con una iluminación que permite la visibilidad para el manejo de las muestras y del aparato en una cámara oscura para evitar la pre-irradiación por la luz visible (Smillie y Hetherington, 1990). Las medidas se realizaron mediante un fluorímetro PAM 2000 (Heinz Walz, Efeltrich, Alemania), utilizando la prueba Fv/Fm (método 1 del fluorómetro) (Lindgren y Hällgren, 1993). La intensidad del modulador se fijó a 80 y el detector a 40, con una intensidad de saturación de 190 (35W, lámpara halógena) durante 0,8 seg. Se midió la FC después de alcanzar el nivel de fluorescencia inicial (F_o). El nivel de fluorescencia alcanzó su nivel máximo (F_m) después de 0,8 seg. Una vez determinados estos parámetros, se calculó la fluorescencia variable en la oscuridad (F_v) aplicando la fórmula: $F_v = F_m - F_o$. Con estas variables se determinó la relación F_v/F_m , que mide la eficiencia potencial máxima del PSII (Abadía *et al.*, 1999). Las determinaciones se hicieron en la zona ovárica de la flor, que se mantuvo hidratada durante todo el proceso del análisis. Los parámetros de fluorescencia F_v se determinaron colocando el sensor del fluorímetro en la zona ovárica y se irradió con luz blanca con una intensidad del flujo de fotones del orden de $6 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Resultados y discusión

Daños causados por las heladas en condiciones controladas

Los análisis estadísticos han mostrado diferencias significativas entre los genotipos para cada temperatura en cuanto a la magnitud de los daños observados en los pistilos (Tabla 2). Los daños después del primer tra-

tamiento (-1°C) oscilaron entre 8% y 26%. Después del segundo tratamiento (-2,5°C) los daños superaron el 50% de las flores examinadas en 3 genotipos, oscilando entre 21% y 57%. Las yemas examinadas se encontraban en el mismo estado fenológico, por lo que las diferencias entre genotipos son independientes de este factor, que es determinante en la evaluación de la tolerancia a las heladas (Simons y Doll, 1976), como ya se había mencionado anteriormente en el almendro (Felipe, 1988).

La evaluación subjetiva de la magnitud de los daños, especialmente después del segundo tratamiento, ha permitido establecer una clasificación de los genotipos en función de su tolerancia a las heladas. Sin embargo, la mayoría de genotipos han cambiado el rango de clasificación de un tratamiento a otro en función de los daños (Tabla 2), lo que confirma que la tolerancia de las yemas de flor también depende de la intensidad de la helada (Mazur, 1969). En cualquier caso, seis genotipos son muy susceptibles a una temperatura de -2,5°C, incluyendo las variedades "Tuono", "Peerless" y "Felisia", mientras que las variedades "Bertina" y "Masbovera" son los cultivares que se mostraron más tolerantes (Tabla 2).

Evaluación mediante la fluorescencia de clorofila (FC)

En general, la emisión de fluorescencia por la clorofila ha mostrado una clara disminución con la reducción de las temperaturas (Tabla 3), como ya se había observado en flores de fresa (Khanizadeh *et al.*, 2000) o en hojas de tomate (Brüggermann y Linger, 1994) o de rosa (Hakam *et al.*, 2000). Así mismo se ha mostrado que la disminución de la FC está relacionada con la inhibición de la actividad fotosintética, lo que se traduce en una reducción importante de la asimilación de CO_2 (Baker y Nie, 1994). La

Tabla 3. Evolución de la fluorescencia de la clorofila de la zona ovárica de las yemas de los cultivares estudiados en función de las temperaturas. Valor relativo de Fv/Fm en relación al normal a 22°C (%)

Table 3. Evolution of chlorophyll fluorescence in the ovary zone of flower buds of the cultivars studied as related to temperature. Relative value of de Fv/Fm in relation to the normal at 22°C (%)

Variedad	Temperatura					Regresión ^f
	22°C	0°C	-1°C	-2°C	-3°C	
Bertina	100	100,2	85,17	70,02	54,97	Sigmoidal
Desmayo Langueta	100	95,39	61,76	59,87	52,04	Lineal
Felisia	100	99,48	95,63	73,01	65,60	Lineal
Ferragnès	100	91,29	90,54	77,15	62,42	Lineal
Guara	100	96,29	93,48	84,21	76,61	Sigmoidal
Marcona	100	92,23	91,44	88,57	80,31	Sigmoidal
Masbovera	100	100,1	88,84	85,31	82,02	Sigmoidal
Moncayo	100	84,74	76,23	74,85	73,12	Lineal
Nonpareil	100	98,5	93,1	87,16	78,44	Sigmoidal
Peerless	100	89,08	83,20	65,71	57,87	Lineal
Mission	100	93,39	87,98	86,12	74,08	Sigmoidal
Tuono	100	99,66	99,51	86,56	63,74	Lineal

reducción de la FC ha seguido dos patrones distintos: lineal y sigmoidal (Tabla 3), como se ha encontrado en las flores de la fresa (Khanizadeh y DeEll, 2001).

En esta especie, si la reducción de Fv/Fm es sigmoidal, las selecciones son susceptibles a las heladas, pero si es lineal son entre tolerantes a susceptibles. En nuestro estudio se ha encontrado una correlación directa entre la rapidez de la disminución de Fv/Fm y los valores de los daños visuales observados a -1°C y -2,5°C en condiciones controladas. Los genotipos con daños elevados presentaron una reducción rápida de Fv/Fm, como "Desmayo Langueta". También se ha observado que "Nonpareil", "Peerless" y "Mission" presentaron una reducción del Fv/Fm sigmoidal, por lo que, siguiendo la clasificación propuesta por Khanizadeh *et al.* (2000), serían entre tolerantes a susceptibles a las heladas, aunque se ha observado que la

pendiente de reducción de Fv/Fm de "Nonpareil" es menos acentuada que la de las otras dos variedades. Ello coincide con los resultados de Snyder y Connell (1995), que mostraron en condiciones controladas que "Nonpareil" era más tolerante a las heladas que "Mission" y "Peerless".

Por otro lado, el Fv/Fm de "Desmayo Langueta" sigue una reducción lineal, mientras que la de "Marcona" sigmoidal, indicando que la primera puede ser más susceptible que la segunda. Ello coincide con los resultados obtenidos en condiciones controladas y en el campo en el año 2005 (Kodad, 2006). En efecto, en la primavera de 2005 se registró una helada de -3°C que produjo daños importantes en las yemas de flor de "Desmayo Langueta", mientras que los daños en "Marcona" fueron insignificantes (datos no mostrados). En el momento de la helada, las dos variedades se encontraban en el estado

fenológico D, por lo que las yemas de flor de "Marcona" son probablemente más tolerantes que las de "Desmayo Largueta", aunque las dos variedades sean susceptibles a las heladas (Felipe, 1988). Ello coincide con los resultados encontrados aplicando la técnica de la fluorescencia de clorofila.

Sin embargo, en algunas variedades consideradas tolerantes a las heladas como "Masbovera" (F.J. Vargas, com. per.) y "Nonpareil" (Snyder y Connell, 1995), la reducción de Fv/Fm presenta el mismo patrón de reducción que el de "Ferragnès" y "Marcona" (Fig. 1), consideradas susceptibles (Miranda *et al.*, 2005), sugiriendo que estas variedades podrían considerarse entre tolerantes a susceptibles. Sin embargo, la reducción de Fv/Fm en función de las temperaturas es más lenta para "Masbovera" que para "Ferragnès" y "Marcona" (Fig. 1).

Aunque las plantas susceptibles y las tolerantes exhiben el mismo patrón de reducción de emisión de fluorescencia por la clorofila, en las plantas sensibles la reducción tiene lugar a un ritmo más acelerado (Bernan y Jefferies, 1990; Hakam *et al.*, 2000). Ello significa que en el momento de establecer el orden de tolerancia a las heladas de las variedades de almendro mediante la fluorescencia de la clorofila, es recomendable basarse más en la rapidez de la reducción de Fv/Fm que en el patrón de su reducción. Con ello se puede concluir que el modelo de clasificación de la tolerancia a las heladas según el patrón de reducción de Fv en función de las temperaturas propuesto por Hakam *et al.* (2000) y Khanizadeh y DeEl (2001) se puede adaptar al almendro.

Los resultados mostraron que 10 genotipos (Tabla 3) presentaron una respuesta sigmoi-

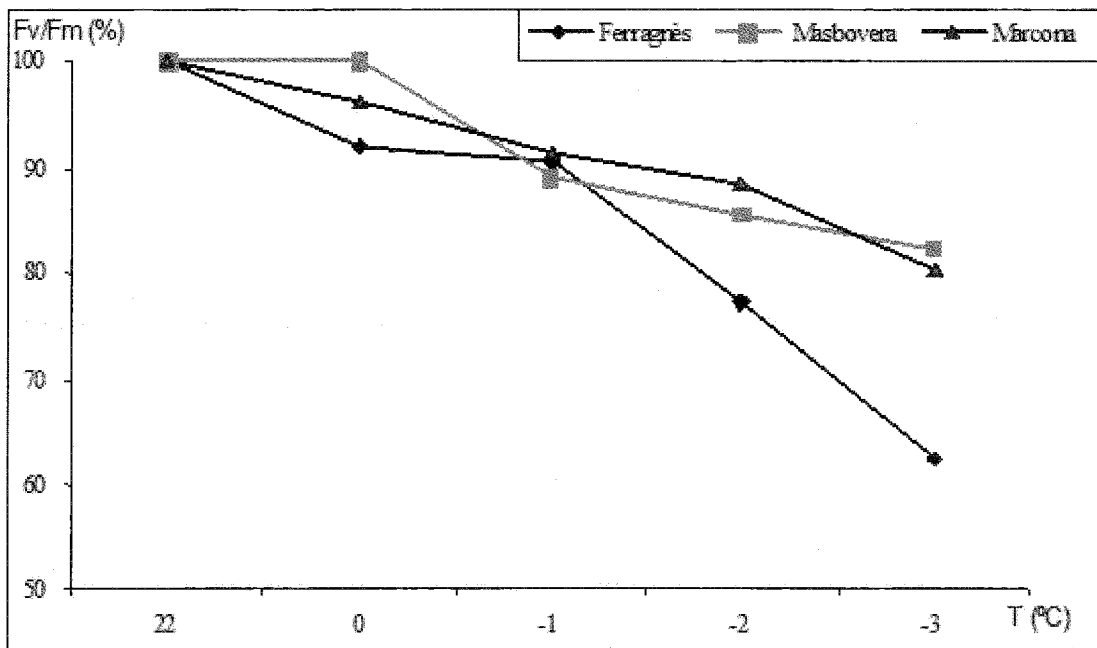


Figura 1. Evolución de Fv/Fm de "Marcona", "Masbovera" y "Ferragnès"
 Figure 1. Evolution of Fv/Fm in "Marcona", "Masbovera" and "Ferragnès"

dal (Q) con un punto de inflexión situado entre -1°C y -2°C , por lo que la reducción de Fv/Fm no fue significativa hasta que se alcanzaron estas temperaturas. Por ello, las flores de estos genotipos deben ser tolerantes a temperaturas comprendidas entre 0°C y -2°C . En todos los genotipos estudiados, los valores más bajos de fluorescencia de la clorofila se registraron a temperaturas comprendidas entre -2°C y -3°C (Tabla 3), indicando que las yemas de flor de todos los genotipos son vulnerables a estas temperaturas. Ello coincide con los presentes resultados y con los otros reseñados (Evreinoff, 1952; Felipe, 1988; Miranda *et al.*, 2005).

Conclusión

La variabilidad de la respuesta de los genotipos estudiados a las heladas, independientemente de su época de floración, confirma la existencia de fuentes de tolerancia a las heladas en almendro. Los resultados obtenidos mediante la fluorescencia de la clorofila en la evaluación de la tolerancia a las heladas de las variedades estudiados coinciden con los obtenidos mediante los ensayos en condiciones de laboratorio en este estudio y los obtenidos en la bibliografía. Estos primeros resultados indican la posibilidad del uso de la fluorescencia de clorofila a gran escala como técnica prometedoras (rápida, cuantitativa y sencilla) para determinar la tolerancia de las descendencias a las heladas en los programas de mejora. No obstante, esta técnica se encuentra todavía en proceso de evaluación, modificación y adaptación al material vegetal y a la mejora en la Unidad de Fruticultura del CITA.

Agradecimientos

Trabajo realizado en el marco del proyecto AGL2007-65853-C02-02 de la CICYT y del Gru-

po Consolidado de Investigación de Aragón A12 "Adaptación y mejora de material vegetal para una fruticultura sostenible". Se agradece los comentarios científicos del Dr S. Khanizadeh y la asistencia técnica de J. Búbal y O. Frontera. FM agradece al Gobierno de Aragón por su financiación (grupo A03).

Bibliografía

- Abadía J, Morales F, Abadía A, 1999. Photosystem II efficiency in low chlorophyll, iron-deficient leaves. *Plant Soil* 215: 183-192.
- Baker NR. (ed.). 1996. *Photosynthesis and the environment*. Kluwer Academic Press, Dordrecht.
- Baker NR, Nie GY, 1994. Chilling sensitivity of photosynthesis in maize. En: Y.P.S. Bajaj (ed.): *Biotechnology of maize*. Berlin Springer-Verlag, pp 465-481.
- Baker NR, Rosenqvist E, 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.* 55: 1607-1621.
- Bernnan RM, Jefferies RA, 1990. The use of chlorophyll fluorescence in assessment of low temperature hardiness in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). *Ann. Appl. Biol.* 117: 667-672.
- Brüggermann W, Linger P, 1994. Long term chilling of young tomato plants under low light. IV. Differential response of chlorophyll fluorescence quenching coefficients in *Lycopersicon* species of different chilling sensitivity. *Plant Cell Physiol.* 35: 585-591.
- Büyükyılmaz M, Kester DE, 1976. Comparative hardiness of flower buds and blossoms of some almond genotypes in relation to time of bloom and leafing. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 101: 344-347.
- Evreinoff VA, 1952. Quelques observations biologiques sur l'amandier. *Rev. Int. Bot. Appl.* 359: 442-459.
- Felipe AJ, 1977. Almendro. Estados fenológicos. *Inf. Téc. Econ. Agrar.* 27: 8-9.

- Felipe AJ, 1988. Observaciones sobre comportamiento frente a heladas tardías en almendro. Rap. EUR 11557: 145-148.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR, 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta.* 990: 87-92.
- Grasselly C, Crossa-Raynaud P, 1980. L'amandier. G.P. Maisonneuve et Larouse, Paris. 265 p.
- Greaves JA., Wilson JM, 1986. Assessment of the non-freezing cold sensitivity of wild and cultivated potato species by chlorophyll fluorescence analysis. *Potato Res.* 29: 509-520.
- Greaves JA, Wilson JM, 1987. Assessment of the sensitivity of wild and cultivated potato species by chlorophyll fluorescence analysis. *Potato Res.* 30: 381-395.
- Hakam N, Khanizadeh S, DeEll J, Ricker C, 2000. Assessing chilling tolerance in roses using chlorophyll fluorescence. *HortScience* 35: 184-186.
- Karukstis KK, 1991. Chlorophyll fluorescence as physiological probe of the photosynthetic apparatus. En: H. Scheer (ed.). *Chlorophylls*. CRC Press, Boca Raton, Fla. pp 769-795.
- Khanizadeh S, DeEll J, 2001. Chlorophyll fluorescence: a new technique to screen for tolerance of strawberry flowers to spring frost. *Small Fruit Rev.* 1: 61-67.
- Khanizadeh S, DeEll J, Hakam N, 2000. Use of chlorophyll fluorescence to evaluate chilling tolerance in strawberry plants. *Acta Hort.* 538: 453-455.
- Kodad O, 2006. Criterios de selección y de evaluación de nuevas obtenciones autocompatibles en un programa de mejora genética del almendro (*Prunus amygdalus* Batsch). Tesis Doctoral. Univ. Lérida.
- Kodad O, Socías i Company R, 2005. Daños diferenciales por heladas en flores y frutos y criterios de selección para la tolerancia a heladas en el almendro. *Inf. Técn. Econ. Agrar.* 101 (4): 349-365.
- Lindgren K, Hällgren JE, 1993. Cold acclimation for *Pinus contorta* and *Pinus sylvestris* assessed by chlorophyll fluorescence. *Tree Physiol.* 13: 97-106.
- Mazur P, 1969. Freezing injury in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 20: 419-448.
- McAlister ED, Meyers J, 1940. The time-course of photosynthesis and fluorescence observed simultaneously. *Smithsonian Institution Miscellaneous Collection* 99: 1-37.
- Miranda C, Santesteban LG, Royo JB, 2005. Variability in the relationship between frost temperature and injury level for some cultivated *Prunus* species. *HortScience* 40: 357-361.
- Proebsting EL, Mills HH, 1978. A synoptic analysis of peach and cherry flower bud hardiness. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 103: 842-845.
- Sakai A, Laracher W, 1987. Frost survival of plants. Response and adaptation to freezing stress. Springer, New York.
- Simons RK, Doll CC, 1976. Morphological and anatomical response of apples to a late spring frost in relation to stage of fruit development. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 101: 315-320.
- Smillie RM, Hetherington SE, 1990. Screening for stress tolerance by chlorophyll fluorescence. En: Y. Hashimoto, H. Nonami, P.J. Karmer y Strain (eds.): *Measurement technique in plant science*. Academic Press, San Diego. pp 229-261.
- Snyder RL, Connell J, 1995. Frost protection. En: W.C. Micke (ed.). 1994: *Almond orchard management*. Univ. Calif. Div. Agric. Sci. Publ. 3364.
- Tijksens LMM, Otma EC, van Kooten O, 1994. Photosystem II quantum yield as measure of radical scavengers in chilling injury in cucumber fruits and bell peppers. A static, dynamic and statistical model. *Planta* 194: 478-486.
- Walker MA, Smith DM, Pauls K, McKersie P, 1990. A chlorophyll fluorescence-screening test to evaluate chilling tolerance in tomato. *HortScience* 25: 334-339.

(Aceptado para publicación el 28 de abril de 2010)