

ANATOMÍA DE LA LÁMINA DE HOJA EN OCHO CULTIVARES DE AGUACATE*

LEAF LAMINA ANATOMY OF EIGHT AVOCADO CULTIVARS

Víctor Manuel González-Calderón¹, Alejandro Facundo Barrientos-Priego^{2,8}, Carlos Alberto Núñez-Colín³, Sweetia Paulina Ramírez-Ramírez², Reuben Hofshi⁴ y Mary Lu Arpaia⁵

¹Campo Experimental Valle del Fuerte. INIFAP. Carretera Internacional México-Nogales, km 1609. Los Mochis, Sinaloa. C. P. 81110. (gcvictim@hotmail.com). ²Instituto de Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco, km 38.5. Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. (sweetia.ramirez@gmail.com). ³Campo Experimental Bajío. INIFAP. Celaya, Guanajuato. A. P. 112. C. P. 38110. (lit007a@gmail.com). ⁴The Hofshi Foundation. 1260 S. Main St. Falbrook, CA 92028. USA. (rhofshi@avocadosource.com). ⁵Department of Botany and Plant Sciences. University of California, Kearney Agricultural Center. 9240 S. Riverbend Avenue. Parlier, CA 93648. USA. (Arpaia@uclac.edu). ⁸Autor para correspondencia: abarrien@correo.chapingo.mx.

RESUMEN

Actualmente en el mundo existen programas de mejoramiento genético en aguacate, para la obtención de nuevos cultivares y portainjertos, con el fin de incrementar productividad y problemas relacionados con estrés en el suelo. El caso de 'Lamb Hass' se ha encontrado que presenta características en hojas como mayor tasa de asimilación de CO₂ y resistencia al ácaro perseá. Estas características pueden estar relacionadas directamente con la anatomía de la hoja. Por lo que es importante conocer dichas características en actuales y nuevos cultivares: 'Hass', 'Reed', 'Gwen', 'GEM', 'Lamb Hass', 'Harvest', BL667 ('Nobel') y BL516 ('Marvel'). Durante 2007 en Chapingo, México, se realizaron cortes transversales de lámina foliar, donde se evaluaron características anatómicas. Se encontraron variables que no presentaron diferencias entre cultivares, que puede adjudicarse a que todos los genotipos utilizados en este estudio excepto 'Reed', provienen de un ancestro común 'Hass'. La agrupación de los cultivares es posible de acuerdo a características anatómicas de su lámina foliar, donde existe variación en las mismas que pueden interpretarse desde el aspecto fisiológico y sus semejanzas por su ancestría. 'Gwen', 'Hass', 'Marvel' y 'GEM', presentaron una cutícula más ancha y un menor ancho de células de parénquima en empalizada, mientras que 'Reed', 'Nobel' y 'Lamb Hass', presentaron características

ABSTRACT

Currently in the world, there are breeding programs in avocado, aiming to obtain new cultivars and rootstocks to increase productivity and stress-related problems on the soil. In the case of 'Lamb Hass'; characteristics in leaves have been found such as increased CO₂ assimilation rate and perseá mite resistance. These features can be directly related to the leaf anatomy. It is important to know these features in current and new cultivars: 'Hass', 'Reed', 'Gwen', 'GEM', 'Lamb Hass', 'Harvest', BL667 ('Nobel') and BL516 ('Marvel'). During 2007 in Chapingo, Mexico, transverse sections of leaf blades were performed, evaluating anatomical features. There were found variables with no differences between cultivars, which may be because all genotypes used in this study except 'Reed', come from a common ancestor 'Hass'. The cultivars groupings are possible according to the anatomical characteristics of its leaf blade, where, there is a variation that can be interpreted from the physiological aspect and its likenesses by their ancestry. 'Gwen', 'Hass', 'Marvel' and 'GEM' had a wider cuticle and less wide palisade parenchyma cells, while 'Reed', 'Nobel' and 'Lamb Hass', had contrasting features, 'Harvest' had intermediate values. The 'Lamb Hass' cultivar presented a leaf

* Recibido: abril de 2011
Aceptado: octubre de 2011

contrastantes con los primeros, 'Harvest' presentó valores intermedios. El cultivar 'Lamb Hass' presentó anatomía de la lámina foliar con características para llevar a cabo más eficientemente la fotosíntesis, debido a los mayores valores que presentó en su parénquima en empalizada I.

Palabras clave: *Persea americana* Mill., cutícula, epidermis, parénquima en empalizada.

INTRODUCCIÓN

La producción comercial del aguacate en México, ha sido afectada por el bajo rendimiento en comparación con otros países (República Dominicana, Israel y Sudáfrica). Existen varios factores que influyen en el rendimiento, entre los más importantes está el cultivar y el portainjerto a utilizar, así como su interacción (Ben-Ya'acov *et al.*, 1993; Ben-Ya'acov y Michelson, 1995). Por lo que a nivel mundial se tienen programas de investigación para la obtención de nuevos cultivares y portainjertos, con el fin de solucionar este problema.

En el caso de cultivares existen varios programas de mejoramiento genético, donde han obtenido individuos con características particulares, siendo el programa de la Universidad de California Riverside, EE.UU. el más importante (Barrientos *et al.*, 2000), el cual en los últimos 30 años ha liberado varios cultivares y puesto a prueba varias selecciones de aguacate con grandes expectativas (Kremer-Khöne, 1998; Arpaia, 2002).

La eficiencia fisiológica de nuevos cultivares de aguacate es de gran importancia, la cual puede estar relacionada con la anatomía de la hoja. Los espacios de aire de la hoja y los arreglos internos de las células, se asocian a la eficacia con la cual las plantas pueden asimilar el CO₂ o intercambiar otros gases (Black *et al.*, 1975).

Según Black *et al.* (1975) se ha demostrado con genotipos de *Lolium*, que el tamaño de la célula del mesófilo es inversamente proporcional a la asimilación de CO₂; es decir, que la fotosíntesis aumenta mientras el tamaño de la célula disminuye. En el caso del manzano se ha probado que los mayores índices de potencial fotosintético están asociados a un mayor grosor de la hoja, peso específico y el número de capas de parénquima en empalizada (Barden, 1978). En manzano se puede observar que el diámetro de las células en el plano de la superficie de la hoja, es tres a cuatro veces más

blade anatomy with features that allow it to carry out photosynthesis more efficiently, due to the higher values of its palisade parenchyma I.

Key words: *Persea americana* Mill., cuticle, epidermis, palisade parenchyma.

INTRODUCTION

The commercial production of avocados in Mexico has been affected by its poor yield compared to other countries (Dominican Republic, Israel and South Africa). There are several factors influencing yield, among the most important are the cultivar and used rootstock, as well as their interaction (Ben-Ya'acov *et al.*, 1993; Ben-Ya'acov and Michelson, 1995). Worldwide, there are research programs aiming to obtain new cultivars and rootstocks in order to solve this problem.

In the case of cultivars, there are several breeding programs that have obtained individuals with particular characteristics, being the program of the University of California Riverside, USA the most important one (Barrientos *et al.*, 2000) which in the recent 30 years has released several cultivars and tested multiple avocado selections with large expectations (Kremer-Khöne, 1998; Arpaia, 2002).

The physiological efficiency of new avocado cultivars has great importance and could be related to the leaf anatomy. The air spaces in the leaf and the internal arrangements of the cells are associated with the efficiency with which plants can absorb CO₂ or exchange other gases (Black *et al.*, 1975).

According to Black *et al.* (1975), with genotypes of *Lolium* has been shown, the mesophyll cell size is inversely proportional to CO₂ assimilation; i. e., photosynthesis increases as cell size decreases. In the case of apple trees, it has been proven that the higher rates of photosynthetic potential are associated with increased leaf thickness, specific gravity and number of layers of palisade parenchyma (Barden, 1978). In apple trees can be seen that the cells' diameter in the surface plane of the leaf is three to four times larger than the palisade's cells, but the vertical axis of palisade's cells is two to three times longer than the thickness of the epidermal cells (Ryugo, 1988).

grande que las células en empalizada, pero el eje vertical de las células en empalizada es dos a tres veces más largo que el grosor de las células epidérmicas (Ryugo, 1988).

Se ha evaluado el porcentaje que ocupa el espacio intercelular en hojas de aguacate, ya que puede estar relacionado con la asimilación de CO₂. Se encontró que dos capas de parénquima en empalizada conformaron aproximadamente dos tercios del grueso total de la hoja, y se determinó también que hay poco espacio intercelular en el parénquima esponjoso (Sharon *et al.*, 2001). De acuerdo con Chartzoulakis *et al.* (2002), la anatomía foliar del aguacate es influenciada por condiciones ambientales, como la sequía, donde se observan grandes cambios, sobre todo en el espacio intercelular del parénquima esponjoso y en general en el grosor de la hoja.

Las diferentes cantidades de cera en la hoja de manzano, puede explicar parcialmente diferencias observadas en el intercambio gaseoso en distintos cultivares, debido a la variación en la limitación del movimiento de gases dentro y fuera de la hoja (Black *et al.*, 1975; Mickelbart *et al.*, 2000). Es de esperarse que la resistencia a algunos insectos y ácaros esté relacionada con el grosor de la cutícula y epidermis de las hojas, así como tricomas y ceras (Mickelbart *et al.*, 2000).

Robbins *et al.* (1974), explicó que hay caracteres estructurales de la hoja que influyen en la cantidad de bióxido de carbono que llega a los cloroplastos. Estos factores incluyen tamaño, posición y comportamiento de estomas y la cantidad de espacio intercelular. También la intensidad y la calidad de la luz que alcanzan a los cloroplastos, son influidas por el grosor de la cutícula y la epidermis, por la presencia de pelos epidérmicos, la disposición de las células del mesófilo y la posición de los cloroplastos en las células.

En ‘Lamb Hass’ se ha encontrado que presenta algunas características únicas en sus hojas como son: mayor tasa de asimilación de CO₂ y resistencia al ácaro persea (Hoddle, 1998). Estas características son de gran importancia para la selección de nuevos cultivares y pueden estar relacionadas directamente con la anatomía de las hojas, ya que en otras especies se ha encontrado que las dimensiones del mesófilo en empalizada de la hoja, está relacionada con su capacidad fotosintética (Wilson y Cooper, 1970); es de esperarse que la resistencia a algunos insectos y ácaros esté también relacionada con la cutícula y epidermis de sus hojas, así como tricomas y ceras (Mickelbart *et al.*, 2000). Por lo anterior es importante conocer las características anatómicas de la hoja en nuevos cultivares de aguacate.

The percentage occupied by the intercellular space in avocado leaves has been assessed, as it may be related to the assimilation of CO₂. It was found that two layers of palisade parenchyma formed about two thirds of the total thickness of the leaf and it was also found that there is little intercellular space in the spongy parenchyma (Sharon *et al.*, 2001). According to Chartzoulakis *et al.* (2002), the leaf anatomy of the avocado is influenced by the environmental conditions such as drought, where, there are significant changes, especially in the intercellular space of the spongy parenchyma, and generally in the leaf thickness.

The different amount of wax on the apple leaf, may partially explain differences in gas exchange in different cultivars, due to the variation in movement limitation of gases inside and outside of the leaf (Black *et al.*, 1975; Mickelbart *et al.*, 2000). It is expected that resistance in some insects and mites is related to the cuticle and epidermis thickness of the leaves as well as trichomes and waxes (Mickelbart *et al.*, 2000).

Robbins *et al.* (1974) explained that there are leaf structural features that influence the amount of carbon dioxide that reaches the chloroplasts. These factors include size, position and stomata behavior and the amount of intercellular space. Also, the intensity and light quality that reach chloroplasts are influenced by cuticle and epidermis thickness by epidermal hair presence disposition of mesophyll cells, and the position of chloroplasts in the cells.

In ‘Lamb Hass’ have been found some unique features in its leaves, such as: increased rate of CO₂ assimilation and persea mite resistance (Hoddle, 1998). These features are of great importance for the selection of new cultivars, and can be directly related to the leaves anatomy, as in other species there has been found that the dimensions of leaf’s palisade mesophyll are related to its photosynthetic capacity (Wilson and Cooper, 1970); it is expected that the resistance to insects and mites is also related to the cuticle and epidermis of the leaves as well as trichomes and waxes (Mickelbart *et al.*, 2000). Therefore, it is important to know the leaf anatomy in new avocado cultivars.

Therefore, this paper aims to study the leaves blade anatomy of eight avocado cultivars and group them by those characteristics.

Por lo anterior se planteó como objetivo estudiar las características anatómicas de la lámina foliar de ocho cultivares de aguacate y agruparlos por dichas características.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

En el estudio se utilizaron los cultivares: ‘Hass’, ‘Reed’, ‘Gwen’, ‘GEM’, ‘Lamb Hass’, ‘Harvest’, ‘Nobel’ (BL667) y ‘Marvel’ (BL516). Los dos primeros cultivares fueron obtenidos por particulares y el resto son producto del programa de mejoramiento genético de la Universidad de California Riverside, EE.UU.

Toma de muestras

Las muestras se tomaron durante el mes de junio del año 2006, en un lote de evaluación localizado en el Rancho “ACW” en Fallbrook, California, EE.UU. Para lo cual se seleccionaron cuatro hojas completamente desarrolladas pero las más jóvenes de brotes completamente expuestos al sol, lo cual se realizó en tres árboles. Las hojas se cortaron y se utilizó un rectángulo de 1*3 cm de la parte media de la lámina, las cuales se fijaron en una solución FAA (50% etanol 96° + 5% ácido acético glacial + 10% formaldehído 40% de pureza + 35% agua).

Cortes anatómicos

Las muestras fijadas en FAA se procesaron durante 2007, con ayuda de un cambiador automático de tejidos (Tissuematon Fisher) con cellosolve y xileno, para transferirse a parafina (55 °C) permaneciendo 72 h dentro de la estufa. Se elaboró el taquete y pirámide de parafina de acuerdo a la metodología propuesta por Sass (1968). En un micrótopo rotatorio (American Optical modelo 820) se realizaron cortes transversales en hoja abarcando la vena central con un grosor de 10 µm, los cuales se montaron con adhesivo Haup y formol al 10% y su tinción fue con safranina y verde fijo (Sass, 1968).

Imágenes digitales

A partir de las preparaciones anatómicas realizadas, se obtuvieron imágenes digitales con una resolución a 40x de objetivo y 10x de ocular en un microscopio marca Leica modelo Galen III, con adaptación para una cámara de vídeo

MATERIALS AND METHODS

Plant material

In this paper were used the following cultivars: ‘Hass’, ‘Reed’, ‘Gwen’, ‘GEM’, ‘Lamb Hass’, ‘Harvest’, ‘Nobel’ (BL667) and ‘Marvel’ (BL516). The first two cultivars were obtained by individuals, and the rest are the product of the genetic improvement program at the University of California Riverside, USA.

Sampling

Samples were taken during June 2006, on an assessment lot located in the Rancho “ACW” in Fallbrook, California, USA. Four fully developed leaves were selected; the youngest of sprouts fully exposed to the sun, this procedure was performed on three trees. The leaves were cut and a rectangle of 1*3 cm from the middle of the blade was used and fixed in FAA solution (50% ethanol at 96° + 5% glacial acetic acid + 10% formaldehyde 40% purity + 35 % water).

Anatomical slices

Samples fixed in FAA were processed during 2007, using an automatic tissue changer (Tissuematon Fisher) with cellosolve and xylene, in order to transfer them to paraffin (55 °C), and remaining 72 h in the oven. Rivet and paraffin pyramid were developed according to the methodology proposed by Sass (1968). In a rotary microtome (American Optical model 820), cross sections were performed in the leaf, covering the central vein with a thickness of 10 µm, which were joined with Haup adhesive and 10% formol and staining with safranin and fast green (Sass, 1968).

Digital images

From anatomical preparations, digital images were obtained with a resolution 40x objective and 10x eyepiece on a Leica Galen III microscope, adapted to a video camera Leica ET-8800N, connected to a GrabIT Pro image capture card for further analysis (Figure 1 and 2).

Evaluated characteristics

In the sections of the leaf blade, there was evaluated: blade thickness, cuticle thickness (Figure 2), thickness of the upper and lower epidermis, palisade parenchyma thickness I and

marca Leica modelo ET-8800N conectado a una tarjeta de captura de imágenes GrabIT Pro para su posterior análisis (Figura 1 y 2).

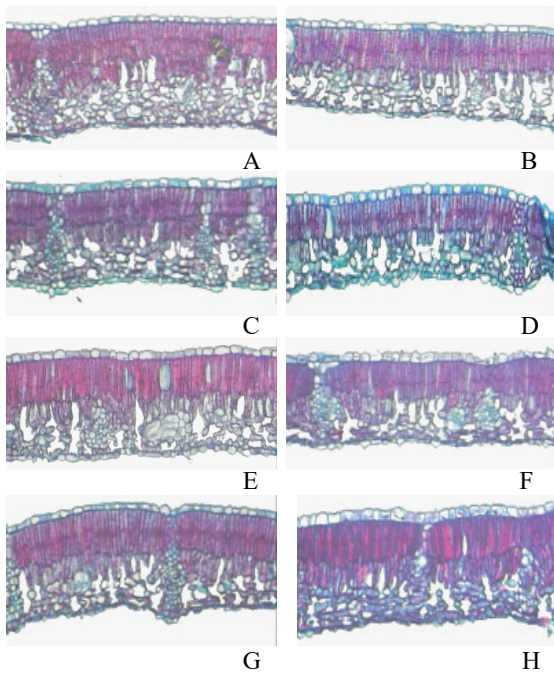


Figura 1. Cortes transversales de lámina de hoja de los cultivares de aguacate. A) 'Hass'; B) 'Reed'; C) 'Gwen'; D) 'GEM'; E) 'Lamb Hass'; F) 'Harvest'; G) 'Nobel'; y H) 'Marvel'.

Figure 1. Cross sections of leaf blade of avocado cultivars. A) 'Hass', B) 'Reed', C) 'Gwen', D) 'GEM', E) 'Lamb Hass', F) 'Harvest', G) 'Nobel' and H) 'Marvel'.

Características evaluadas

En cortes de lámina foliar se evaluó: grosor de la lámina; grosor de cutícula (Figura 2); grosor de la epidermis superior e inferior; grosor de parénquima en empalizadas I y II; grosor de parénquima esponjoso; área de espacio intercelular en parénquima esponjoso; relación longitud/diámetro de parénquima en empalizada I; diámetro, longitud, y área de células de parénquima en empalizada I.

Se realizaron cinco observaciones por repetición, para posteriormente utilizar el promedio de éstas en el análisis estadístico.

Análisis de imágenes

Las mediciones en las imágenes digitales se realizaron mediante el analizador de imágenes Image Tool ver. 3.00 (Wilcox *et al.*, 2002).

II, spongy parenchyma thickness, intercellular space area in spongy parenchyma, length/diameter ratio of palisade parenchyma I; diameter, length and area of palisade parenchyma cells I.

There were five observations per repetition, then, their average was used in statistical analysis.

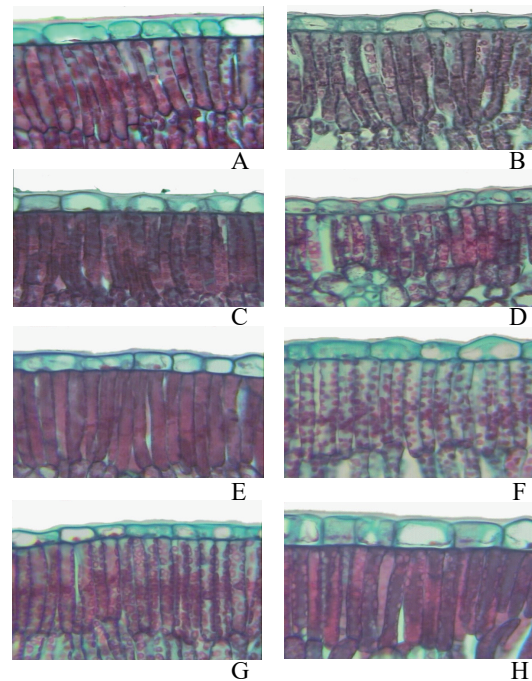


Figura 2. Sección de corte transversal de hoja de aguacate para la medición de cutícula. A) 'Hass'; B) 'Reed'; C) 'Gwen'; D) 'GEM'; E) 'Lamb Hass'; F) 'Harvest'; G) 'Nobel'; y H) 'Marvel'.

Figure 2. Cross section of avocado leaves for cuticle measuring. A) 'Hass', B) 'Reed', C) 'Gwen', D) 'GEM', E) 'Lamb Hass', F) 'Harvest', G) 'Nobel', and H) 'Marvel'.

Image analysis

The measurements on digital images were performed using Image Tool image analyzer ver. 3.00 (Wilcox *et al.*, 2002).

Statistical analysis

A canonical discriminant analysis (CDA) was performed to compare the different cultivars and to identify the variables that would explain better the variability between the formed groups, as well as to obtain the Mahalanobis distance and see if there are differences between these groups (Johnson, 1998). Additionally, an analysis of variance among cultivars was performed and Tukey tests at $p \leq 0.05$ for each variable were conducted.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis discriminante canónico (ADC), para comparar los diferentes cultivares y determinar las variables que expliquen de mejor manera la variabilidad entre grupos formados, así como obtener la distancia de Mahalanobis y verificar si existen diferencias entre estos grupos (Jonhson, 1998). Adicionalmente se realizó un análisis de varianza entre cultivares y se llevaron a cabo pruebas de Tukey a una $p \leq 0.05$ para cada variable.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis discriminante canónico

Las tres primeras funciones canónicas aportaron 87.01%, de éstas la primera aportó 60.79% de la varianza, la segunda 15.45% y la tercera 10.77% (Cuadro 1).

Se observó en la estructura canónica, que las variables más importantes de la primera función canónica (FC1) fueron la epidermis del haz y el espacio intercelular; y en el caso de las variables más importantes de la segunda función canónica (FC2) fueron la epidermis del haz, la cutícula y el ancho de célula de parénquima en empalizada y en la tercer función canónica (FC3) fueron epidermis del envés y la relación largo/ancho de las células de parénquima en empalizada (Cuadro 2).

Cuadro 2. Estructura canónica total de características anatómicas de lámina foliar de ocho cultivares de aguacate.
Table 2. Total canonical structure of leaf blade anatomical features of eight avocado cultivars.

Variable	FC1	FC2	FC3
Ancho de hoja	-0.347902	0.19488	0.062494
Epidermis haz	0.477786	0.69043	-0.04644
Empalizada I	-0.285359	-0.322592	0.080345
Empalizada II	-0.33262	0.313432	0.095513
Parénquima esponjoso	-0.313246	0.218455	0.255448
Epidermis envés	0.102219	0.040551	-0.584586
Cutícula	-0.349457	0.459479	0.205833
Largo de célula (L) ^z	-0.346792	-0.346641	0.069316
Ancho de célula (A) ^z	0.078266	-0.54632	0.194895
Relación L/A ^z	-0.230834	0.069778	-0.433813
Área ^z	-0.098585	-0.147132	0.138721
Espacio intercelular ^y	0.421252	-0.210298	-0.204052

^z= célula de parénquima en empalizada I; ^y= entre parénquima esponjoso; FC= función canónica.

RESULTS AND DISCUSSION

Canonical discriminant analysis

The first three canonical functions accounted for 87.01%; of these, the first contributed 60.79% of the variance, the second 15.45% and 10.77% the third (Table 1).

Cuadro 1. Valores propios del análisis discriminante canónico de las variables anatómicas de lámina foliar de ocho cultivares de aguacate.

Table 1. Values of the canonical discriminant analysis of the leaf blade anatomical variables of eight avocado cultivars.

Función canónica	Valor propio	Varianza explicada	Varianza acumulada	P> F
1	38.8998	0.6079	0.6079	< 0.0001
2	9.8877	0.1545	0.7624	< 0.0001
3	6.8942	0.1077	0.8701	< 0.0001
4	5.0378	0.0787	0.9489	< 0.0001
5	1.8121	0.0283	0.9772	< 0.0001
6	1.2149	0.019	0.9962	0.002
7	0.2456	0.0038	1	0.4815

P> F= probabilidad de F.

La primera función canónica fue definida por la epidermis del haz y el espacio intercelular, que se ha asociado con la eficiencia que se asimila el CO_2 y el intercambio de otros gases (Black *et al.*, 1975), además de la resistencia a algunos insectos y ácaros (Mickelbart *et al.*, 2000).

La segunda función canónica estuvo definida por la epidermis del haz, la cutícula y ancho de la hoja, esta última se puede interpretar como índice de potencial fotosintético, ya que está muy relacionada con este proceso de acuerdo a Barden, (1978). Por otra parte puede explicar diferencias en el intercambio gaseoso (Black *et al.*, 1975; Mickelbart *et al.*, 2000), principalmente por diferencias en cutícula y epidermis.

La representación gráfica de los grupos en un plano factorial, dio como resultado la distribución de estos mismos en el espacio en las dos primeras funciones canónicas (FC1 y FC2), donde 'Nobel' y 'Reed' se encontraron distribuidos juntos (Figura 3), lo que indica que son genotipos anatómicamente muy similares de acuerdo a las variables evaluadas en este estudio, esto se debe posiblemente a que algún individuo de 'Reed' presentó el ancho de hoja mayor a los otros dos y muy semejante a 'Nobel'. 'Harvest' presentó el menor espacio intercelular, aunque fue similar a 'GEM', y 'Gwen', 'Nobel' y 'Reed' presentaron el mayor espacio intercelular. Por otra parte, 'Hass', 'Marvel' y 'Lamb Hass' se comportaron como intermedios.

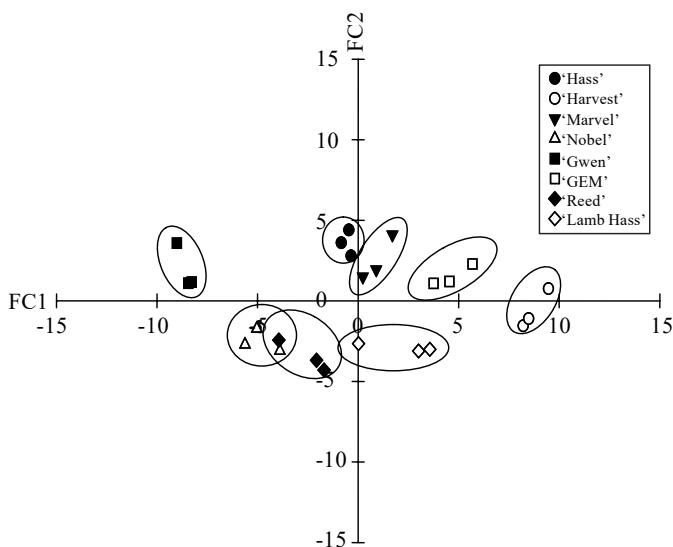


Figura 3. Distribución de genotipos de aguacate en el primer plano factorial del análisis discriminante canónico.
Figure 3. Distribution of avocado genotypes in the first factorial plane of the canonical discriminant analysis.

In the canonical structure was observed that the most important variables of the first canonical function (FC1) were the bundle epidermis and the intercellular space; in the case of the most important variables of the second canonical function (FC2) were the bundle epidermis, the cuticle and the width of palisade parenchyma cell and in the third canonical function (FC3) were the underside epidermis and the length/width ratio of palisade parenchyma cells (Table 2).

The first canonical function was defined by the bundle epidermis and the intercellular space, which has been associated with the efficiency of assimilating CO_2 and other gas exchange (Black *et al.*, 1975), as well as resistance to some insects and mites (Mickelbart *et al.*, 2000).

The second canonical function was defined by the bundle epidermis, the cuticle and leaf width, this can be interpreted as a photosynthetic potential index, since it is closely related to the process according to Barden, (1978). On the other hand, it can explain differences in gas exchange (Black *et al.*, 1975; Mickelbart *et al.*, 2000), mainly due to differences in cuticle and epidermis.

The graphical representation of groups in a factorial plane, resulted in their distribution in the space on the first two canonical functions (FC1 and FC2), where 'Nobel' and 'Reed' were distributed together (Figure 3), indicating that they are anatomically very similar genotypes according to the variables assessed in this paper, this may be because some individual from 'Reed' had greater leaf width than the other two and very similar to 'Nobel'. 'Harvest' had the lowest intercellular space, although it was similar to 'GEM' and 'Gwen'; 'Nobel' and 'Reed' showed the highest intercellular space. On the other hand, 'Hass', 'Marvel' and 'Lamb Hass' behaved as intermediates.

It was observed that, 'Gwen' cultivar had a greater leaf thickness and 'Harvest' had lower thickness, according to the first canonical function (FC1). 'Gwen', 'Hass', 'Marvel' and 'GEM', had a thicker cuticle and less width of palisade parenchyma cells, while 'Reed', 'Nobel' and 'Lamb Hass' showed characteristics contrasting with the first and 'Harvest' had intermediate values. The genotypes that showed greatest similarity were the cultivars 'Nobel' and 'Reed', as well as 'Hass' and 'Marvel'.

Se observó que el cultivar ‘Gwen’ presentó un grosor mayor de hoja y ‘Harvest’ presentó un menor grosor, de acuerdo a la primera función canónica (FC1). ‘Gwen’, ‘Hass’, ‘Marvel’ y ‘GEM’ presentaron un mayor grosor de cutícula y un menor ancho de células de parénquima en empalizada, mientras que ‘Reed’, ‘Nobel’ y ‘Lamb Hass’ presentaron características contrastantes con los primeros y ‘Harvest’ presentó valores intermedios. Los genotipos que presentaron mayor similitud fueron los cultivares ‘Nobel’ y ‘Reed’, así como ‘Hass’ y ‘Marvel’.

Al calcular la distancia de Mahalanobis (Cuadro 3), entre los cultivares se obtuvieron las probabilidades con el fin de determinar la presencia de similitudes entre ellos. Se encontraron varios valores que no presentaron diferencia significativa, que se puede adjudicar a todos los genotipos utilizados en este estudio excepto ‘Reed’, provienen de un ancestro común que es ‘Hass’, pero a diferente nivel.

Cuadro 3. Distancia de Mahalanobis y probabilidad de las variables anatómicas de lámina foliar de ocho cultivares de aguacate.

Table 3. Mahalanobis distance and probability of the leaf blade anatomical variables of eight avocado cultivars.

Genotipo ($p^{\wedge}D$)	‘GEM’	‘Gwen’	‘Harvest’	‘Hass’	‘Lamb Hass’	‘Marvel’	‘Nobel’	‘Reed’
‘GEM’		185.0178	53.0591NS	94.5928	58.665 NS	61.981 NS	133.4579	100.2507
‘Gwen’	0.02		316.1284	105.5082	153.299	115.898	43.202 NS	78.326 NS
‘Harvest’	0.217 NS	0.006		120.2725	68.623 NS	101.5838	189.393	147.334
‘Hass’	0.0794	0.0643	0.0496		77.866 NS	55.09 NS	73.481 NS	72.311 NS
‘Lamb Hass’	0.185 NS	0.03	0.1424 NS	0.114 NS		45.234 NS	68.738 NS	37.334 NS
‘Marvel’	0.169 NS	0.0534	0.0693	0.205 NS	0.275 NS		87.865 NS	68.823 NS
‘Nobel’	0.0401	0.294 NS	0.0191	0.126 NS	0.142 NS	0.0913 NS		16.994 NS
‘Reed’	0.0711	0.113 NS	0.0326	0.13 NS	0.357 NS	0.1417 NS	0.741 NS	

NS= no significativo a una $p \leq 0.07$; p = probabilidad; D= distancia.

A continuación se explican las distancias menores obtenidas: el cultivar ‘Reed’ no presentó diferencias significativas con ‘Nobel’, esto se debió que un individuo de ‘Reed’ presentó el espesor de su hoja similar a ‘Nobel’, por lo que se puede considerar dentro del grupo.

El cultivar ‘Reed’ no presentó diferencias significativas con ‘Lamb Hass’, tal vez debido que un individuo de ‘Lamb Hass’ mostró un espesor de su hoja similar a ‘Reed’; de tal manera, que puede estar considerado dentro de este grupo.

Los cultivares que presentaron mayor diferencia entre sí fueron ‘Harvest’ con ‘Gwen’, estas diferencias se observaron principalmente en el ancho de cutícula y en la relación largo/ancho de células de parénquima en empalizada I.

When the Mahalanobis distance (Table 3) was calculated between the cultivars, the odds were obtained in order to determine the presence of similarities between them. Several values that did not show significant differences were found, which may be because all genotypes used in this paper except ‘Reed’, come from a common ancestor: ‘Hass’, but at a different level.

The following explains the shorter distances obtained: ‘Reed’ cultivar showed no significant differences with ‘Nobel’, this was because an individual of ‘Reed’ had a leaf thickness similar to ‘Nobel’, and so it can be considered within the group.

‘Reed’ cultivar showed no significant differences with ‘Lamb Hass’, perhaps because an individual of ‘Lamb Hass’ showed a similar blade thickness to ‘Reed’; so it may be considered within this group.

The cultivars that showed the greatest difference among themselves, were ‘Harvest’ with ‘Gwen’; these differences were mainly observed in the cuticle’s width and in the length/width ratio of palisade parenchyma cells I.

As mentioned above, all cultivars except ‘Reed’ are related, so their similarities are strong as indicated by the Mahalanobis distance (Table 3). Where ‘Hass’ is the direct ancestor of ‘Gwen’ and from this, ‘GEM’, ‘Harvest’, ‘Lamb Hass’, ‘Marvel’ and ‘Nobel’ were derived.

Analysis of variance and mean test

The analysis of variance (Table 4) indicated that in all variables there is a cultivar which is statistically different to another.

Cabe indicar como se mencionó anteriormente, todos los cultivares, excepto ‘Reed’ están emparentados, por lo que sus semejanzas son fuertes como lo indicó la distancia de Mahalanobis (Cuadro 3). Donde ‘Hass’ es el ancestro directo de ‘Gwen’, y a partir de este último se derivó ‘GEM’, ‘Harvest’, ‘Lamb Hass’, ‘Marvel’ y ‘Nobel’.

Análisis de varianza y prueba de medias

El análisis de varianza (Cuadro 4), indicó que en todas las variables existe un cultivar que difiere estadísticamente con otro.

Al comparar los datos obtenidos sobre ‘Hass’ en el estudio realizado por Chartzoulakis *et al.* (2002), con los obtenidos en el presente estudio en epidermis de haz y envés, parénquima en empalizada I y II y parénquima esponjoso, se pudo constató que en forma general son similares. Aunque hay diferencias en cuanto a grosor, donde las hojas de California, EE. UU, fueron más gruesas que las reportadas por Chartzoulakis *et al.* (2002) en Creta, Grecia; cuyas proporciones difirieron principalmente en la epidermis del envés (6.89 vs 4.24 μm : Grecia vs EE. UU).

El cultivar ‘Hass’ presentó la cutícula más gruesa y el menor grosor en la epidermis del envés (Cuadro 5), lo que puede indicar que para una mayor eficiencia de los productos que se asperjan al cultivar, es mejor que la aplicación sea dirigida al envés de la hoja (Beakbane, 1967).

By comparing data obtained on ‘Hass’ in the paper by Chartzoulakis *et al.* (2002), with those obtained in this paper about bundle and underside epidermis, palisade parenchyma I and II and spongy parenchyma; it was found that in general, they are quite similar. Although, there are differences in thickness, where California, USA, leaves, were thicker than those reported by Chartzoulakis *et al.* (2002) in Crete, Greece; whose proportions differ mainly in the underside epidermis (6.89 vs 4.24 μm : Greece vs USA).

Cuadro 4. Análisis de varianza de las variables anatómicas de lámina foliar de cultivares de aguacate.

Table 4. Analysis of variance of leaf blade anatomical variables of avocado cultivars.

Variables	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F
Ancho de hoja	28152.85	4021.84	4.41*
Epidermis haz	889	127	20.2*
Empalizada I	3462.75	494.68	4.52*
Empalizada II	2471.99	352.99	5.32*
Parénquima esponjoso	7808.09	1115.44	3.85*
Epidermis envés	100.11	14.3	3.06*
Cutícula	12.42	1.77	6.5*
Largo de célula (L) ^z	3607.68	515.38	8.96*
Ancho de célula (A) ^z	23.39	3.34	7.75*
Relación L/A	24.8	3.54	3.54*
Área ^z	552973.53	78996.22	8.7*
Espacio intercelular ^y			2.36**

^z= célula de parénquima en empalizada I; ^y= entre parénquima esponjoso; *, **= altamente significativo, con un $p \leq 0.05$ y $p \leq 0.01$, respectivamente.

Cuadro 5. Características anatómicas en un corte transversal de lámina foliar que explican las diferencias entre cultivares de aguacate.

Table 5. Anatomical features in a cross section of leaf blade that explains the differences between avocado cultivars.

Cultivar	Ancho de hoja (μm)	Cutícula (μm)	Epidermis haz (μm)	Parénquima en empalizada I (μm)	Parénquima en empalizada II (μm)	Parénquima esponjoso (μm)
‘Marvel’	231.06 a	2.3 ab	22.567 a	64.15 bc	47.617 a	76.167 a
‘Hass’	221.03 ab	2.9 a	20.742 ab	68.867 abc	41.442 ab	75.717 a
‘GEM’	214.59 abc	2.1083 bc	19.958 abc	63.35 bc	32.25 b	51.742 b
‘Harvest’	207.43 abc	1.5917 c	19.492 abc	59.933 c	31.383 b	51.475 b
‘Lamb Hass’	206.89 abc	2.1667 bc	18.267 bc	79.533 a	36.067 b	57.892 ab
‘Gwen’	192.17 bc	2.4667 ab	17.258 cd	70.475 abc	41.5 ab	65.742 ab
‘Reed’	184.33 bc	1.9417 b	14.542 de	74.575 ab	35.292 b	64.308 ab
‘Nobel’	178.19 c	2.0667 ab	12.767 e	71.592 abc	39.225 ab	68.225 ab
DMSH	38.301	0.6624	3.1786	13.266	10.324	21.577
CV (%)	14.77	23.83	13.77	15.15	21.37	26.63

DMSH= diferencia mínima significativa honesta; CV= coeficiente de variación. Medias con letras iguales dentro de la misma columna, significa que no existen diferencias, Tukey $p \leq 0.05$.

En el espacio intercelular no existieron diferencias significativas entre los ocho cultivares (Cuadro 6), por lo que se podrá prescindir de esta variable en estudios posteriores, aunque el coeficiente de variación fue casi 27%, que explica el porqué no se encontraron diferencias y probablemente se requieran más repeticiones para encontrar diferencias.

'Harvest' presentó la cutícula más delgada, por lo que se puede considerar que tenga una mayor capacidad para el intercambio gaseoso (Black *et al.*, 1975; Mickelbart *et al.*, 2000). El cultivar Marvel tiene un mayor grosor en la

'Hass' cultivar had the thickest cuticle and thinner underside epidermis (Table 5), which may indicate that for more efficiency of sprayed products, it is better the application underside the leaf (Beakbane, 1967).

In the intercellular space there were no significant differences among the eight cultivars (Table 6), so, this variable can be ignored in future studies, although, the coefficient of variation was about 27%, which explains why there were no differences, and probably this will require more repetitions in order to find differences.

Cuadro 6. Características anatómicas en un corte transversal de lámina foliar que explican las diferencias entre cultivares de aguacate.

Table 6. Anatomical features in a cross section of leaf blade that explains the differences between avocado cultivars.

Cultivar	Espacio intercelular (μm^2)	Epidermis envés (μm)	Largo de célula ^y L (μm)	Ancho de célula ^y A (μm)	Relación ^y L/A	Área ^y (μm^2)
'Marvel'	6868 a	11.3167 ab	64.367 bcd	9.5417 b	6.7083 ab	622.29 b
'Hass'	6200.7 a	9.3833 b	67.283 bcd	9.075 bc	7.3917 ab	627.47 b
'GEM'	7985.4 a	12.575 a	61.433 cd	8.6667 c	7.1167 ab	562.12 b
'Harvest'	7563.9 a	10.4 ab	58 d	9.4083 bc	6.1333 b	587.74 b
'Lamb Hass'	6962.9 a	12.075 ab	78.917 a	10.425 a	7.5417 a	814.01 a
'Gwen'	5732.6 a	10.8083 ab	69.783 abc	8.9667 bc	7.8167 a	616.28 b
'Reed'	7830.9 a	9.8167 b	72.758 ab	9.5833 b	7.5833 a	565.24 b
'Nobel'	6237.1 a	10.375 ab	68.275 bc	9.5167 b	7.2167 ab	668.05 b
DMSH	2359.9	2.7396	9.6153	0.8325	1.2684	120.78
CV (%)	26.89	19.93	11.22	6.98	13.91	15.05

^y= célula de parénquima en empalizada; DMSH= diferencia mínima significativa honesta; CV= coeficiente de variación. Medias con letras iguales dentro de la misma columna significa que no existen diferencias, Tukey $p \leq 0.05$.

epidermis del haz, por lo que puede presentar una mayor resistencia a plagas insectiles y algunos ácaros (Mickelbart *et al.*, 2000), mientras que 'Nobel' tuvo un comportamiento contrario.

Se observó que el cultivar Reed, está dentro de las medias de todas las variables evaluadas, a pesar de provenir de ancestros distintos a los que provienen el resto de los cultivares. 'Lamb Hass' presentó en el parénquima en empalizada I, mayor largo de célula en empalizada, ancho de célula en empalizada y área de célula en empalizada, probablemente porque este cultivar es más eficiente fotosintéticamente (Wilson y Cooper, 1970), tal como lo indicó (Hoddle, 1998). El cultivar GEM presentó el menor valor en ancho de célula, que puede estar reflejado por la eficiencia fotosintética (Black *et al.*, 1975).

'Harvest' had the thinnest cuticle, so it may have a greater capacity for gas exchange (Black *et al.*, 1975; Mickelbart *et al.*, 2000). Marvel cultivar has a greater thickness in the bundle epidermis, so it may have greater resistance to insect pests and some mites (Mickelbart *et al.*, 2000), while 'Nobel' showed a contrary behavior.

There was observed that the Reed cultivar is within the means of all variables, despite of coming from different ancestors than the other cultivars. 'Lamb Hass' showed in the palisade parenchyma I, a higher palisade cell's length, width and area of palisade cell, probably because this cultivar is more photosynthetically efficient (Wilson and Cooper, 1970), as said by Hoddle (1998). The GEM cultivar had the lowest value in cell width, which may be reflected by the photosynthetic efficiency (Black *et al.*, 1975).

CONCLUSIONES

La agrupación de los cultivares es posible de acuerdo a características anatómicas de su lámina foliar, donde existe variación en las mismas que pueden interpretarse desde el aspecto fisiológico y las semejanzas por los ancestros.

El cultivar Reed se ubicó dentro de las medias de todas las variables evaluadas, a pesar de provenir de cultivares distintos ('Nabal'*'Anaheim'), a los que provienen el resto de los cultivares (descendientes de 'Hass').

El cultivar 'Lamb Hass' realiza más eficientemente la fotosíntesis, ya que los valores que presenta en sus características del tejido el parénquima en empalizada I, son los de mayor valor.

LITERATURA CITADA

- Arpaia, M. L. 2002. Enhancement of avocado productivity, plant improvement-selection and evaluation of improved varieties and roots stocks. *In*: Witney, G. (ed.). Proceedings of the California Avocado Research Symposium, 2002. Riverside California Avocado Commission. University of California Riverside. Riverside, USA. 43-53 pp.
- Barden, J. A. 1978. Apple leaves their morphology and photosynthetic potential. *HortScience*. 13:644-645.
- Barrientos-Priego, A. F.; Muñoz-Pérez, R. B.; Borys, M. W. y Martínez-Damián, M. T. 2000. Cultivares y portainjertos del aguacate. *In*: Téliz, D.; González, H.; Rodríguez, J. y Dromundo, R. (eds.). El aguacate y su manejo integrado. Mundi-Prensa S. A. de C. V. México. 35-54 pp.
- Beakbane, A. B. 1967. A relationship between leaf structure and growth potential in apple. *Ann. Appl. Biol.* 60:67-76.
- Ben-Ya'acov, A.; Michelson, E. and Sela, I. 1993. Rootstock effect on avocado vigor and productivity. *Acta Hort.* 349:191-195.
- Ben-Ya'acov, A. and Michelson, E. 1995. Avocado rootstocks. *Horticultural Reviews*. 17:381-429.

CONCLUSIONS

Grouping cultivars is possible according to the anatomical characteristics of their leaf blade, where, there is a variation that can be interpreted from the physiological aspect and similarities by their ancestors.

'Reed' cultivar was within the means of all variables, despite of coming from different cultivars ('Nabal'*'Anaheim') from those which the other cultivars come from (descendants of 'Hass').

'Lamb Hass' cultivar performs photosynthesis more efficiently, since the values found in their tissue characteristics of palisade parenchyma I, have the highest value.

End of the English version



- Black, C. C.; Goldstein, L. D.; Ray, T. B.; Kestler, D. P. and Mayne, B. C. 1975. The relationship of plant metabolism to internal leaf and cell morphology and the efficiency of CO₂ assimilation. *In*: Burris, R. H. and Black, C. C. (eds.). CO₂ Metabolism and plant productivity. University Park Press. Baltimore, USA. 113-139 pp.
- Chartzoulakis, K.; Patakas, P.; Kofidis, G.; Bosabalidis, A. and Nastou, A. 2002. Water stress affects leaf anatomy, gas exchange, water relations and growth of two avocado cultivars. *Scientia Hort.* 95:39-50.
- Hoddle, M. S. 1998. Biology and management of the perseá mite. *California Avocado Society Yearbook*. 82:75-85.
- Johnson, D. E. 1998. Métodos multivariados aplicados al análisis de datos. International Thomson Editores. Distrito Federal, México. 566 p.
- Kremer-Khöne, S. 1998. Maintenance and evaluation of avocado cultivars and selections. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*. 21:35-37.
- Mickelbart, M. V.; Miller, R.; Parry, S.; Arpaia, M. L. and Heath, R. 2000. Avocado leaf surface morphology. *California Avocado Society Yearbook*. 84:139-150.
- Robbins, W. W.; Weier, T. E. y Stocking, C. R. 1974. *Botánica*. Editorial Limusa. D. F., México. 608 p.

- Ryugo, K. 1988. Fruit culture, its science and art. John Wiley & Sons. New York, USA. 344 p.
- Sass, J. E. 1968. Botanical microtechnique. The Iowa State University Press. Iowa, USA. 227 p.
- Sharon, Y.; Bravdo, B. and Bar, N. 2001. Aspects of the water economy of avocado trees (*Persea americana*, cv. Hass). South African Avocado Growers' Association Yearbook. 24:55-59.
- Wilcox, C., D.; Dove, S. B.; Doss, W. M. and Greer, D. B. 2002. UTHSCSA Image Tool. IT version 3.0. Department of Dental Diagnostic Science. University of Texas Health Science Center. San Antonio, USA. 57 p.
- Wilson, D. and Cooper, J. P. 1970. Effect of selection for mesophyll cell size on growth and assimilation in *Lolium perenne* L. New Phytologist. 69:233-245.