



UNIVERSIDAD
MIGUEL HERNÁNDEZ



CENTRO DE EDAFOLOGÍA Y
BIOLOGÍA APLICADA DEL SEGURA



CONSEJERÍA DE
AGRICULTURA
Y AGUA



INSTITUTO MURCIANO DE
INVESTIGACIÓN Y
DESARROLLO
AGROALIMENTARIO

TESIS DOCTORAL

Análisis de diversos factores biológicos que influyen en el proceso de floración, producción y calidad del fruto en variedades de cerezo (*Prunus avium* L.) cultivadas en la Región de Murcia

Directoras:

Dra. Nuria Alburquerque Ferrando

Dra. María Serrano Mula

Federico García Montiel

Ingeniero Agrónomo

Orihuela, 2010



UNIVERSIDAD
MIGUEL HERNÁNDEZ



CENTRO DE EDAFOLOGÍA Y
BIOLOGÍA APLICADA DEL SEGURA

Las Doctoras Nuria Alburquerque Ferrando, Científico Titular del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC) y María Serrano Mula, Catedrática de Fisiología Vegetal de la Universidad Miguel Hernández

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Análisis de diversos factores biológicos que influyen en el proceso de floración, producción y calidad del fruto en variedades de cerezo (*Prunus avium* L) cultivadas en la Región de Murcia”, realizada por D. Federico García Montiel, bajo su dirección y supervisión, para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández

En Orihuela, a 26 de Marzo de 2010

LAS DIRECTORAS DE TESIS

Fdo.: Nuria Alburquerque Ferrando

Fdo.: María Serrano Mula

José Ramón Díaz Sánchez, Director del Departamento de Tecnología Agroalimentaria de la Universidad Miguel Hernández de Elche, AUTORIZA la presentación de la Tesis Doctoral titulada: “**Análisis de diversos factores biológicos que influyen en el proceso de floración, producción y calidad del fruto en variedades de cerezo (*Prunus avium* L.) cultivadas en la Región de Murcia**”, realizada por D. Federico García Montiel bajo la Dirección de las Dras. Nuria Albuquerque Ferrando y María Serrano Mula.

Y para que conste, firma la presente autorización en Orihuela a 26 de Marzo de 2010.



José Ramón Díaz Sánchez

P.O. Daniel Valero Garrido



DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

Campus de Orihuela. Ctra. de Beniel, Km. 3,2 – 03312 ORIHUELA

Telf.: 96 674 9708 – Fax: 96 674 96 77

E-mail: jr.diaz@umh.es

Los trabajos recogidos en la presente Memoria han sido realizados en los laboratorios e instalaciones del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (IMIDA) y en la Escuela Politécnica Superior de Orihuela. El material vegetal extraído así como los datos de campo, fueron tomados en las colecciones varietales que tiene el IMIDA en Jumilla y en una finca privada situada en Abarán.

Durante el periodo de realización de la presente Memoria de Tesis, el Ingeniero Agrónomo D. Federico García Montiel ha trabajado en la Oficina Comarcal Agraria "Vega Alta" de Cieza, dependiente de la Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia. También ha participado en otros proyectos de investigación con investigadores del IMIDA y colaborado en algunos proyectos llevados a cabo en el CEBAS.

Los resultados presentados en esta Memoria han sido recogidos en las siguientes publicaciones:

Albuquerque, N., García-Montiel, F., Carrillo, A., Burgos, L. (2008). Chilling and heat requirements of sweet cherry cultivars and the relationship between altitude and the probability of satisfying the chill requirements. *Environmental and Experimental Botany* **64(2)**: 162-170. **(CAPÍTULO I)**.

Albuquerque, N., García-Montiel, F., Burgos, L. (2007). Short communication. Influence of storage temperature on the viability of sweet cherry pollen. *Spanish Journal of Agricultural Research* **5(1)**: 86-90. **(CAPÍTULO II)**.

García-Montiel, F., Serrano, M., Martínez-Romero, D., Albuquerque, N. (2010). Factors influencing fruit set and quality in different sweet cherry cultivars. *Spanish Journal of Agricultural Research (en prensa)*. **(CAPÍTULO III)**.

Además, durante el periodo investigador se ha publicado un artículo de divulgación :

Albuquerque, N., Carrillo, A. y García Montiel, F. (2007). Estimación de las necesidades de frío para florecer de variedades de cerezo. *Fruticultura Profesional* **164**: 5-12.

Asimismo, se han presentado parte de los resultados en varios congresos científicos.

En el V Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas y IV Congreso Iberoamericano de Ciencias hortícolas de la SECH, celebrado en Oporto en mayo de 2005, se presentó la siguiente comunicación:

García-Montiel, F., Serrano, M., Martínez-Romero, D., Valero, D., Carrillo, A. y Albuquerque, N. (2005). Biología floral y caracterización pomológica de tres variedades de cerezo (*Prunus avium* L.) cultivadas en el Sureste de España. *SECH, Oporto. Vol.2: 144.*

En las VII Jornadas de Experimentación en Fruticultura de la SECH, celebradas en el IRTA de Mas Badia (Gerona) del 23-30 de mayo de 2008, se presentaron las siguientes comunicaciones:

García-Montiel, F., Cos, J., Carrillo, A, López, G. (2008). Parámetros de calidad en variedades de cereza en función del estado de maduración y de la precocidad.

En el VI *Internacional Cherry Symposium*, celebrado en Chile en noviembre de 2009, se presentaron las siguientes comunicaciones:

García-Montiel, F., Carrillo, A., Frutos, D., Cos, J., López, G. (2009). Quality parameters evaluated in sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars in function of their earliness and maturity. **P-80: 147.**

García-Montiel, F., Frutos, D., Carrillo, A., Cos, J. (2009). Chilling requirements of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. **P-81: 148.**

AGRADECIMIENTOS

Llegado al tramo final de esta memoria de tesis, me vienen a la memoria todas aquellas personas que de una forma u otra han contribuido con su granito de arena para que esta tesis viera la luz. Aunque me resulte difícil expresar con palabras los sentimientos, espero que pueda mostrar mi más sincero agradecimiento y mi gratitud a todas ellas.

Como no, quiero expresar mi agradecimiento de forma muy especial a mis directoras, la doctora D^a María Serrano Mula por su paciencia, aportaciones, correcciones, consejos y apoyo en tareas de elaboración de datos y resultados de laboratorio y a la doctora D^a Nuria Alburquerque Ferrando, la que más me ha empujado a concluir la tesis, por su tenacidad, esfuerzo, dedicación, comprensión y apoyo recibido. Investigadora exigente pero muy eficiente que me ha inculcado unos valores que siempre tendré presente.

A todos los coautores de los trabajos presentados; el doctor D. Lorengo Burgos Ortíz, el doctor D. Domingo Martínez Romero y el Investigador técnico D. Antonio Carrillo Navarro (compañero e inestimable amigo), por sus aportaciones, dedicación, toma de datos de campo, análisis de laboratorio y elaboración de los mismos.

Al Dr. D. Diego Frutos Tomás, del Departamento de Cultivos Leñosos del IMIDA por creer en mi, animarme y apoyarme desde que iniciamos proyectos en cerezo, cultivo difícil y que nadie apostaba por el en la Región de Murcia.

A mis compañeros del grupo cerezo del IMIDA, el Dr. D. José E. Cos Terrer y a D. Gregorio López Ortega (predoctoral), por sus aportaciones, sugerencias y consejos en todos los trabajos que hemos realizado y que estamos realizando en esta especie vegetal.

A todos los del laboratorio del Departamento de Tecnología de Alimentos por su ayuda en la realización de los análisis de los frutos.

Al Dr. D. José Egea Caballero, del Departamento de Mejora y Patología Vegetal del CEBAS-CSIC, por sus aportaciones bibliográficas así como por los inestimables consejos y sugerencias a la hora de la elaboración del artículo sobre necesidades de frío.

A mis padres, responsables en cierta medida de que haya llegado hasta aquí.

Y por su puesto, a mi mujer y mis hijos. Ellos son los verdaderos artífices de los logros obtenidos.

Muchas gracias por TODO.



A mi madre
in memoriam



ÍNDICE



RESUMEN	i
ABSTRACT	vii
INTRODUCCIÓN	1
1. Descripción botánica y taxonómica	1
2. Origen y distribución del cultivo del cerezo	2
3. Importancia económica.....	3
4. Situación actual	3
5. Requerimientos edafoclimáticos	4
5.1. La temperatura	5
5.2. La luz	5
5.3. El agua	6
5.4. La humedad atmosférica	6
5.5. La profundidad del suelo	6
5.6. La textura y la estructura del suelo	7
6. Plagas y enfermedades	8
6.1. Plagas	8
6.2. Enfermedades	9
7. Necesidades de frío y calor para florecer	11
8. La flor del cerezo. Aspectos de la biología floral relacionados con la fecundación	14
8.1. Receptividad del estigma	15
8.2. Germinación del polen y crecimiento del tubo polínico.....	15
8.3. Viabilidad del óvulo	16
8.4. Influencia de la temperatura sobre la viabilidad del polen almacenado.....	17
9. Incompatibilidad polen-pistilo	18
10. Evaluación de parámetros relacionados con la biología floral que influyen en la producción del cerezo.....	23
11. Calidad del fruto	25
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	31
CAPÍTULO I: Chilling and heat requirements of sweet cherry cultivars and the relationship between altitude and the probability of satisfying the chill requirements.....	33
Abstract	35
1. Introduction	36



2. Materials and methods.....	37
2.1. Plant material	37
2.2. Determination of chilling and heat requirements.....	38
2.3. Experimental design.....	40
2.4. Statistical analysis.....	42
3. Results.....	42
4. Discussion.....	48
5. References.....	51

CAPITULO II: Short communication. Influence of storage temperature on the viability of sweet cherry pollen..... 55

Abstract	57
1. Introduction.....	58
2. Materials and methods	59
2.1. Plant material	59
2.2. Experimental design	59
2.3. Statistical analysis	59
3. Results and discussion	60
4. Conclusions.....	63
5. References	64

CAPITULO III: Factors influencing fruit set and quality in different sweet cherry cultivars..... 67

Abstract	69
1. Introduction	71
2. Materials and methods.....	73
2.1. Plant material.....	73
2.2. Culture conditions	73
2.3. Experimental design	73
2.4. Fruit quality parameters	75
2.5. Statistical analysis.....	76
3. Results and discussion	76
3.1. Flower bud density	77
3.2. Number of flower buds per node and flower buds drop	77
3.3. Total number of flowers per node and fruit set	79
3.4. Double fruits.....	83
3.5. Fruit quality parameters	84
4. References	88



DISCUSIÓN GENERAL	95
1. Necesidades de frío y calor para florecer	95
2. Efecto de la conservación a bajas temperaturas sobre la viabilidad del polen	97
3. Diferentes aspectos de la biología floral, del cuajado y maduración de los frutos	99
BIBLIOGRAFÍA	107
CONCLUSIONES GENERALES	131
ANEXO I : Artículo publicado en <i>Environmental and Experimental Botany</i> (2008) 64:162- 170.....	135
ANEXO II : Artículo publicado en <i>Spanish Journal of Agricultural Research</i> (2007) 5(1): 86-90.....	147
ANEXO III :Artículo en prensa en <i>Spanish Journal of Agricultural Research</i> ...	157





RESUMEN



RESUMEN

El cultivo del cerezo (*Prunus avium* L.) presenta una serie de ventajas frente a otros cultivos como son bajos requerimientos de agua y abono nitrogenado, con las consiguientes ventajas de protección del medioambiente, o su tolerancia al Virus de la Sharka (*Plum Pox Virus*, PPV), de gran impacto en albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.), en ciruelo (*Prunus domestica* L.) y en melocotonero (*Prunus persica* L.). Por otra parte, la climatología del sureste español, disponiendo de las variedades adecuadas, permite la entrada en producción del cerezo con una precocidad que es difícilmente igualada por otras regiones españolas y muy por delante de las regiones productoras en Europa, lo que permitiría a las empresas exportadoras de la Región de Murcia explotar la ventaja comercial de las primeras cerezas del mercado. Existe un gran interés del cerezo para la Región de Murcia y en esta Tesis se han estudiado y analizado una serie de parámetros para obtener información acerca del comportamiento de siete variedades de cerezo cultivadas en la Región de Murcia.

Muchas especies leñosas de hoja caduca y otros árboles frutales perennes de climas templados requieren una cierta cantidad de frío invernal para superar el periodo de reposo invernal y posteriormente un aumento de la temperatura para que se produzca la floración. Entre estas especies se incluye el cerezo, en el que además existen diferencias entre cultivares, por lo que el conocimiento de los requerimientos de frío y de calor de cada variedad permitirá seleccionar aquella más adecuada para una zona determinada y así, conseguir una floración completa y una alta productividad. Además, el conocimiento de las necesidades de frío también es importante en los programas de mejora, cuando se pretende elegir parentales para obtener variedades de floración temprana.

En este sentido, se han calculado los requerimientos de frío de las variedades de cerezo 'Brooks', 'Burlat', 'Cristobalina', 'Marvin', 'New Star', 'Ruby' y 'Somerset' con diferentes métodos: el número de horas de frío por debajo de 7 °C y los modelos Utah y Dinámico. En este estudio no se encontraron diferencias entre los modelos Utah y Dinámico cuando se estimaron los requerimientos de frío de estas variedades, lo que puede deberse a que las temperaturas durante el invierno en el noreste de Murcia son moderadas y los valores bajo cero son poco



importantes. Sin embargo, los valores obtenidos con el modelo del número de horas por debajo de 7 °C no se correlacionaron con los del modelo Utah ni con los del modelo Dinámico, lo que sugiere que no es apropiado para el cálculo de las necesidades de frío de las variedades de cerezo en las condiciones de clima mediterráneo. Los resultados mostraron que las dos variedades de floración temprana, 'Cristobalina' y 'Brooks', tienen requerimientos de frío más bajos, las variedades 'Burlat', 'New Star', 'Ruby' y 'Somerset' requerimientos de frío intermedios y 'Marvin' los requerimientos más elevados, siendo también la de floración más tardía. Todas estas variedades pueden alcanzar sus requerimientos de frío en la Región de Murcia cuando se cultiven por encima de los 650 m sobre el nivel del mar, e incluso 'Cristobalina' y 'Brooks' podrían superar el período de reposo invernal cultivadas por encima de los 325 m.

La mayoría de las variedades de cerezo son auto-incompatibles, por lo que requieren polinización cruzada. Sin embargo, los períodos de floración pueden variar entre 3 y 4 semanas entre los distintos cultivares, por lo que puede que no se solapen en el tiempo las floraciones de dos cultivares que se desee cruzar por sus adecuadas características, siendo necesario realizar una polinización cruzada controlada. Con esta finalidad el polen de la variedad polinizadora debe ser recolectado y secado para posteriormente proceder a la polinización manual. Sin embargo, la viabilidad del polen disminuye rápidamente dependiendo de las condiciones de almacenaje y de la variedad. En el estudio realizado con seis variedades de cerezo ('Books', 'Cristobalina', 'Marvin', 'New Star', 'Ruby' y 'Somerset') se ha comprobado que en la mayoría de ellas la viabilidad del polen se perdía casi por completo después de 60 días de conservación a 4 °C. Sin embargo, los porcentajes de germinación del polen de todas las variedades estudiadas fueron suficientemente elevados después de un año de conservación a -20 °C. Solamente después de 540 días de almacenaje se observó una disminución significativa de la viabilidad del polen, excepto en 'Cristobalina' y 'Somerset' en las cuales seguía manteniéndose en los valores iniciales, incluso después de este largo período de conservación.

Debido a que el interés de los mejoradores es diverso, el conocimiento de la biología floral, del comportamiento productivo o de la calidad de los frutos de las variedades estudiadas puede ayudar a escoger las más adecuadas para cultivar en condiciones de clima mediterráneo o para que sean utilizadas como parentales en futuros programas de mejora. Así se han caracterizado las variedades de cerezo en



lo referente a su densidad de floración, número de yemas florales por ramillete de Mayo, número de flores totales desarrolladas por ramillete de Mayo y porcentaje de yemas florales caídas, así como porcentaje de frutos cuajados y porcentaje de frutos dobles. Además, en este estudio se analizaron algunos parámetros relacionados con la calidad del fruto en diferentes estados de maduración, como peso, color, sólidos solubles totales, acidez total y firmeza.

Tanto el número de yemas florales y el número de flores totales por ramillete de Mayo como el porcentaje de cuaje presentaron una gran variabilidad entre variedades y entre los diferentes años de cultivo analizados. Los parámetros de calidad también fueron diferentes entre variedades y estados de maduración. La variedad 'Brooks' presentó una elevada producción de yemas florales, un número apropiado de flores por ramillete y sus frutos presentaron en estado de madurez comercial altos niveles de sólidos solubles, de índice de maduración y de firmeza. Las variedades 'Burlat' y 'Somerset' presentaron unos valores intermedios en los parámetros relacionados con la biología floral y con la calidad del fruto. En 'Cristobalina' y 'Marvin' el número de yemas florales y el número de flores por nudo en los diferentes años fue aceptable. Además la variedad auto-compatible 'Cristobalina' presentó un alto porcentaje de cuaje de frutos en todos los años de estudio, aunque el tamaño de la cereza y sus valores de firmeza fueron muy bajos. 'Marvin' presentó un porcentaje de frutos dobles bajo, un período de maduración bastante corto y fue la variedad que presentó el color rojo más oscuro. 'Ruby' presentó una alta producción de yemas florales y un elevado número total de flores por ramillete, aunque el porcentaje de cuajado fue muy errático y el porcentaje de frutos dobles elevado. No obstante, esta variedad mostró un valor apropiado de índice de maduración y una firmeza elevada. Finalmente, la variedad auto-compatible 'New Star' se caracterizó por presentar un elevado porcentaje de cuajado de frutos y bajo porcentaje de frutos dobles, así como un buen tamaño del fruto y una firmeza elevada.



ABSTRACT



ABSTRACT

Sweet cherry (*Prunus avium* L.) crop has advantages over other crops as low water and nitrogen fertilizer requirements, with important environment benefits, or resistance to *Plum Pox Virus* (PPV), which causes important losses in apricot (*Prunus armeniaca* L.), plum (*Prunus domestica* L.) and peach (*Prunus persica* L.) yields. Moreover, using appropriate cultivars, the weather conditions of the south-east of Spain allow sweet cherry early productions that are difficult to obtain in other Spanish regions or in Europe. Companies from Murcia region could take the advantage of this precocity to export the fruits. There is a great interest of sweet cherry crop in Murcia and, in this Thesis, some parameters have been analyzed to obtain information about the agronomical behaviour of seven sweet cherry cultivars grown in the Region of Murcia.

Deciduous fruit trees and other woody perennials of temperate climates, including sweet cherry, require a certain amount of winter chilling to overcome their dormancy. Once the chilling requirements have been satisfied, heat is also required to reach full bloom. Sweet cherry cultivars have different chilling and heat requirements for breaking rest and inducing flowering. The knowledge of these requirements may be valuable in the selection of the appropriate cultivars for producers and to avoid losses caused by an inadequate cultivar selection in a particular area. Determination of chilling and heat requirements is also important within a breeding programme, when choosing parents to obtain early flowering cultivars.

In this work chilling requirements of seven sweet cherry cultivars ('Brooks', 'Burlat', 'Cristobalina', 'Marvin', 'New Star', 'Ruby' and 'Somerset') were calculated using different methods (hours below 7 °C, Utah and Dynamic models), which were compared. Differences were not found between Utah and Dynamic models when estimating the chilling requirements for these seven sweet cherry cultivars, which could be due to mean temperatures during winter are moderate and negative chilling values, generated with the Utah model, are not important. However, the results obtained with the hours below 7 °C model were not correlated with either the Dynamic or the Utah model, suggesting that this model is not appropriate for calculation of sweet cherry chilling requirements in our Mediterranean climatic conditions. Results showed that the early flowering



cultivars, 'Cristobalina' and 'Brooks', had the lowest chilling requirements. 'Burlat', 'New Star', 'Ruby' and 'Somerset' had medium chilling and heat requirements for flowering, and 'Marvin' showed the highest values and also the latest blooming date. All the studied cultivars may have their chilling requirements satisfied in the region of Murcia, if grown at least 650 m above sea level. Some cultivars, such as 'Cristobalina' and 'Brooks', could successfully break dormancy already when grown at an altitude above 325 m.

In breeding programs controlled cross-pollinations require the use of selected pollen from elite cherry cultivars, since most of them are self-incompatible and bloom times often do not overlap between cultivars (from 3 to 4 weeks differences between late and early flowering). Due to these differences usually pollen is collected and dried before hand pollination. However, pollen viability decreases depending on storage conditions and genotype. In this study pollen of six sweet cherry cultivars, 'Brooks', 'Cristobalina', 'Marvin', 'New Star', 'Ruby' and 'Somerset' was used and pollen viability was completely lost for most cultivars after only 60 days of storage at 4 °C. Nevertheless, results indicate that pollen viability could be maintained at reasonably high percentages after storage at -20 °C during one year for all cultivars studied. Storage for 540 days at -20 °C produced a decrease in pollen viability, with the exception of 'Cristobalina' and 'Somerset' pollen that maintained similar viability at all times.

Since the interest of breeders is diverse, the knowledge of floral biology, fruit set behaviour and fruit quality of the cultivars studied here could be useful to choose the appropriate ones to be grown under Mediterranean climatic conditions or used as parentals in future breeding programs. Therefore, the cultivars 'Brooks', 'Marvin', 'Ruby', 'Burlat', 'New Star' and 'Somerset' have been characterized. Flower density, flower buds drop, number of developing flower buds per node, total number of flowers per node, fruit set and percentage of double fruits have been determined. Also some parameters related to fruit quality, such as fruit weight, colour, soluble solids, total acidity and firmness were evaluated at different ripening stages. The number of flower buds per node, total number of flowers per node, fruit set and percentage of double fruits had a great variability between cultivars and the year also had a strong influence in these parameters, with the exception of double fruit production. Likewise, all fruit quality parameters were very different between cultivars and ripening stages. The cultivar 'Brooks' showed high production of flower buds and an appropriate total number



of flowers per node in different years, besides high levels of total soluble solids (TSS), ripening index and fruit firmness. 'Burlat' and 'Somerset' ranged medium values of most of the analyzed floral biology and fruit quality parameters. In 'Cristobalina' and 'Marvin' the production of flower buds and total number of flowers per node in different years was acceptable. In addition, the self-compatible cultivar 'Cristobalina' had high fruit set percentages in all years of study, but the fruit size and the fruit firmness values were low. In 'Marvin' the percentage of double fruits was low. The maturation period of 'Marvin' fruits was very short and at the commercial ripening stage these fruits showed the darkest red colour. Although 'Ruby' recorded high production of flower buds and total number of flower per node in different years, the fruit set was very erratic and the percentage of double fruits was high. This cultivar presented a good ripening index and fruit firmness levels. The self-compatible cultivar 'New Star' was characterized by consistent high fruit set percentages and low percentage of double fruits as well as by good fruit size and firmness levels.





INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1.- Descripción botánica y taxonómica.

La familia *Rosaceae* es una familia monofilum perteneciente al orden de las Rosales, con un gran interés a nivel botánico. Esta familia incluye a su vez una subfamilia, la *Prunoidea*, que abarca un gran número de especies, llegando a las 200 en el género *Prunus*. De los 95 géneros que componen esta familia destacan los géneros *Malus* (manzanos), *Pyrus* (perales), *Fragaria* (fresas) y *Prunus* (frutales de hueso).

El género *Prunus* también es uno de los más importantes desde el punto de vista agrícola ya que entre sus especies se encuentran las especies frutales cultivadas de mayor importancia económica en las regiones templadas del planeta. Este género se divide en varios subgéneros: *Prunus* (albaricoqueros y ciruelos), *Amygdalus* (melocotoneros y almendros) y *Cerasus* (cerezos). Todas las especies presentan particularidades comunes, como son el desarrollo de un único ovario con dos óvulos de forma característica, de los que uno degenera rápidamente tras la antesis, y la fructificación en forma de drupa, en la que el endocarpio maduro va unido a la propia semilla, asemejándose a una testa protectora.

El cerezo (*Prunus avium* L.) es la especie más importante cultivada del subgénero *Cerasus*. Es diploide ($2n=16$), de porte erguido y gran vigor pudiendo alcanzar 25 m de altura. Su raíz es pivotante y su corteza lisa de color marrón rojizo con trazados en forma de anillos. Sus hojas son simples, ovado-oblongas, acuminadas y grandes (7,5- 12,5 cm de longitud y 3,5- 5 cm de anchura) con márgenes aserrados, haz glabro y envés ligeramente pubescente. El pecíolo posee unas glándulas rojizas cerca del limbo. Las flores son blancas y se encuentran agrupadas en umbelas. La fruta es una drupa roja o granate, globosa o con forma de corazón que contiene un solo hueso. Los órganos fructíferos predominantes son los ramilletes de mayo que presentan varias yemas florales agrupadas y una vegetativa. También posee ramos mixtos y chifonas (son como ramos mixtos de menor grosor y longitud) en menor proporción (Lichou *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1996).



2.- Origen y distribución del cultivo del cerezo.

Se considera que el cerezo es originario del Oriente próximo, en la región comprendida entre las costas del Mar Negro y el Mar Caspio (Asia Menor, Irán, Iraq y Siria) (Vavilov, 1951). Watkins (1976) sugirió que la primera especie diploide de *Prunus* surgió en el Asia Central y que el cerezo actual deriva de este cerezo ancestral. Su centro de domesticación fue también Asia Central, más tarde pasó a Asia Menor y desde allí se introdujo en el Mediterráneo a través de la civilización griega (Lichou *et al.*, 1990). Su llegada a la Europa septentrional se produjo, sin embargo, desde China atravesando Rusia y Oriente próximo. En este proceso de distribución de la especie, el estornino (*Sturnus vulgaris*) ha sido identificado como el principal agente de diseminación (Lichou *et al.*, 1990). Al expandirse el cerezo por toda Europa, dentro de cada área surgieron ecotipos que difieren entre sí en cuanto a las adaptaciones ecológicas y la morfología de las hojas y el fruto (Kolesnikova, 1975).

En América del Norte fue introducido por los colonos ingleses hacia el año 1629. En Europa el cerezo se encuentra presente en la mayoría de los países y *Prunus avium* es la especie dominante en las zonas meridionales (España, Italia, Sur de Francia), mientras que *Prunus cerasus*, más resistente al frío, manifiesta una buena aclimatación en las zonas más septentrionales (Norte de Francia, Alemania, Países del Este) (Iglesias, 1991).

En la actualidad se encuentran cerezos en numerosas regiones del globo de clima templado, entre los 35° y los 55° de latitud Norte y Sur (Figura 1).

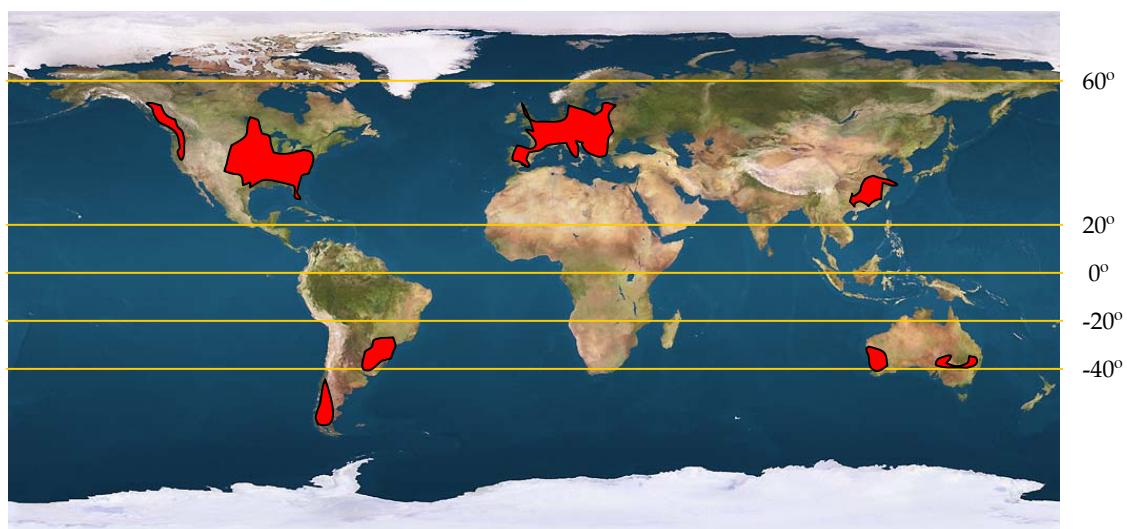


Figura 1.- Distribución del cerezo en el mundo (Fuente: FAOSTAT, 2007).



En España, debido al proceso de adaptación a diferentes condiciones ambientales, se puede encontrar una gran diversidad de variedades locales.

3.- Importancia económica.

La producción mundial de cereza en el año 2007, se cifra en 2,08 millones de toneladas (t) en una superficie de cultivo de 374.911 hectáreas (ha). El 65% de esta producción pertenece a la cereza dulce, es decir 1,74 millones de t.

Los principales países productores del mundo de cereza dulce son Turquía, Estados Unidos, Irán, e Italia que alcanzan una producción de 1.078.967 t, o sea el 52% del total.

España ocupa el séptimo lugar en cuanto a producción con 72.000 t y 32.921 ha (FAOSTAT 2007). Aragón, Cataluña y Extremadura son las tres comunidades autónomas que más cereza cosechan, con una producción conjunta del 71% respecto al total de España. Las plantaciones de cerezo se concentran principalmente en los valles del Ebro y del Jerte, en las zonas montañosas de Castellón, Valencia y Alicante, y en Granada y Jaén (MAPYA, 2007).

4.- Situación actual

El cultivo del cerezo en España, durante mucho tiempo ha estado localizado en zonas más o menos integradas en áreas de montaña en donde se da muchas veces de forma espontánea. Son áreas montañosas de no mucha altura, de pendiente moderada, abancaladas, formando valles limpios y suaves, en donde las pluviometrías medias anuales oscilan en torno a los 800 mm, de regular reparto y en donde no son frecuentes oscilaciones térmicas intensas o temperaturas inferiores a cero grados desde el inicio de la primavera. La expansión del cultivo hacia otras zonas ha cambiado la estructura productiva tradicional, pasando de explotaciones de pequeña dimensión en terrazas, con pocos medios de cultivo, a nuevas plantaciones intensivas, con poca pendiente, más tecnificadas, con riego localizado por goteo y en las que se cultivan nuevas variedades procedentes de diferentes programas de mejora genética. Este es el caso del cultivo del cerezo en la Región de Murcia y en otras comunidades vecinas como la valenciana y andaluza.

Según datos de la Estadística Regional (2007) en la Región de Murcia se cultivan aproximadamente 110 ha de cerezo, de las cuales 31 ha, están plantadas recientemente y aún no producen.



El cultivo se localiza principalmente en dos comarcas: Altiplano, que abarca a los municipios de Jumilla (con 50 ha), Yecla (con 30 ha), y Noroeste (con 24 ha), donde el municipio de Cehegín cuenta con 17 ha y el resto (6 ha) se localizan en la Vega Alta del Segura. La distribución varietal es distinta, ya que para las zonas más cálidas se utilizan variedades precoces y con menos requerimientos de frío invernal como 'Early Bigi', 'Primulat', 'Early Lory', que empiezan a recolectarse en la última decena del mes de abril. A continuación le siguen otras de origen Californiano como 'Ruby', 'Brooks', 'Garnet', 'Prime Giant', y otras de origen Canadiense como 'New Star', 'Santina', ambas autofértiles, ubicadas en zonas medias en cuanto a maduración se refiere. Para las zonas de mayor altitud, que son más frías, podemos encontrar 'Lapins', 'Cristalina', 'Sweet Heart', de maduración tardía. Estas son autofértiles, con índices de productividad más elevados que las anteriores, ya que son variedades tipo "spur", de poco crecimiento vegetativo y mucha inducción floral (Marsal, 1990).

El portainjerto más utilizado es el SL-64, una selección de Santa Lucía (*Prunus mahaleb*) llevada a cabo por el INRA en Francia, de multiplicación vegetativa que da una gran uniformidad y buena compatibilidad con todas las variedades. Como inconveniente podemos señalar que es sensible a la asfixia radicular, comportándose mal en terrenos pesados, muy abundantes en la Región de Murcia (Frutos, 1995).

Las nuevas plantaciones se hacen utilizando el patrón Mariana 2624 con intermediario de Adara, que se ha mostrado compatible con gran número de variedades de cerezo (Moreno, 1991) y se adapta bien a suelos calizos y compactos. Es una selección clonal de mirobolán (*Prunus cerasífera*) originario de Murcia y conocido también con el nombre de Santa Elvira o Mirobolán SE. Este patrón tiene un buen comportamiento con la mayoría de variedades de cerezo, comunicando mayor tamaño al fruto que otros portainjertos (Frutos, 1995).

5.- Requerimientos edafoclimáticos

Aunque el cerezo se clasifica a menudo como una especie rústica, no prospera en cualquier condición. Es necesario precisar los factores climáticos y edafológicos que favorecen o dificultan el buen desarrollo de este cultivo siendo útil conocerlos para la elección del material vegetal, así como para la elección y preparación de la parcela (Lichou *et al.*, 1990).



La temperatura

El cerezo es menos resistente que el guindo a los inviernos fríos; sin embargo, los daños sobre las raíces no aparecerán hasta que la temperatura no descienda de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lichou *et al.*, 1990). Esta temperatura depende del portainjertos y también de la variedad. Las heladas invernales registradas en Rumanía, que oscilaron entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-33\text{ }^{\circ}\text{C}$, permitieron evaluar la resistencia al frío invernal de una amplia colección de variedades de cerezo. Las variedades más resistentes en tales condiciones fueron 'Van', 'Stella' y 'Uralise de Bistrita' (Petre, 1987). La menor tasa de daños se registró en las variedades 'Boambe de Cotnari' y en 'Lambert Compact', con el 12% de daños. Las más afectadas fueron 'Sam', con el 30% y 'Mona' con el 22% (Movileanu *et al.*, 1989).

Las heladas invernales en Picanea (Italia) con varios días a $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ provocaron la muerte de un 36% de las yemas de flor en la variedad 'Flamingo' y un 98% en 'Durancina della Goccia' (Roversi y Ughini, 1989, Roversi *et al.*, 1993).

La sensibilidad a las heladas primaverales también depende del estado fisiológico del árbol. Así, ciertas variedades como 'Ulster Delflash' y 'Guillaume', pueden resistir una temperatura de $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en estado F de Baggiolini (1952) o de flor abierta, mientras que el fruto joven o recién cuajado es sensible a partir de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Saunier, 1978). Además la temperatura juega un papel fundamental en los procesos de floración, polinización y formación del fruto (Lichou *et al.*, 1990).

La luz

Este factor es primordial en el cerezo. Una buena poda de todo el árbol influye favorablemente en el crecimiento de los ramos, la inducción floral, la apertura de los botones y la longevidad de los ramilletes de mayo. Un deficiente aclareo, en particular en el interior de árboles insuficientemente iluminados y en ciertas condiciones de cultivo (alta densidad), puede provocar un alargamiento y un desnudamiento progresivo de las ramas.

La sombra tiene un efecto negativo sobre la calidad de los frutos. Además, en ciertas condiciones, las radiaciones solares, pueden ocasionar quemaduras sobre el tronco que se traducen en necrosis de la corteza que se agrieta (Lichou *et al.*, 1990).



El agua

El cerezo se considera una especie poco exigente en agua, en particular cuando se acerca la recolección. Puede soportar pluviometrías débiles, aunque para una producción óptima se requieren precipitaciones de 500 a 600 mm, así como un buen reparto de las lluvias a lo largo del año. Las primaveras y veranos demasiado secos inducen una movida débil de los árboles y una mala asimilación mineral que dificultan el engrosamiento de los frutos (Soing, 1989). En general, las plantaciones tradicionales en climas mediterráneos cubren sus necesidades de agua a partir de las lluvias y las reservas del suelo, aunque el riego mejora el crecimiento y la productividad.

Por otra parte, el encharcamiento prolongado le resulta perjudicial ya que provoca asfixia radicular (Juhasz *et al.*, 1996). El límite de resistencia a la asfixia radicular es de algunos días en períodos de vegetación, mientras que puede soportar de 95 a 100 días en la época de reposo vegetativo con el patrón Merisier (semilla de *Prunus cerasus* L.) y de 70 a 75 días con Santa Lucía (*Prunus mahaleb*) (Saunier, 1970).

En un ensayo de comportamiento en campo de las selecciones 'Adara' (*Prunus cerasifera*), 'SL-64' (*Prunus mahaleb*) y 'Colt' (*Prunus avium* x *Prunus pseudocerasus*) realizado por Moreno *et al.* (1996), el menos sensible a la asfixia radicular fue 'Adara' seguido de 'Colt', y por último 'SL-64'. 'Adara' parece ser un buen patrón para prevenir los problemas de asfixia radicular en suelos pesados o en condiciones de riego por inundación, en donde otros patrones pueden morir. También se comporta bien en suelos calizos, no adecuados para otros patrones de cerezo.

La humedad atmosférica

La humedad ambiental alta en los meses lluviosos y calurosos es perjudicial cuando ocurre cerca de la floración y de la maduración, ya que causa daños diversos: dificulta la actividad de las abejas, provoca la aparición de *Monilia sp.* sobre flores y frutos e induce el rajado de frutos (Lichou *et al.*, 1990).

La profundidad del suelo

El suelo determina las posibilidades de enraizamiento y la alimentación hídrica y mineral de los árboles. Las características del enraizamiento son



variables según los portainjertos o patrones. El enraizamiento de Santa Lucía y Merisier está muy extendido en los primeros 60 cm de suelo. Más allá de esta profundidad la proporción de raíces que encuentra es mínima (Lichou *et al.*, 1990).

Las raíces del cerezo pueden alcanzar profundidades de hasta 2,5 m, si el suelo se lo permite. El patrón de crecimiento es de tipo sigmoideo (Gil, 1997). En el cerezo, la tasa de crecimiento radicular es de 1 cm/día (Faust, 1989).

El patrón 'Colt' posee un sistema radicular muy superficial que lo hace sensible a la sequía. Ciertos guindos o cerezos ácidos utilizados como portainjertos presentan una buena resistencia a la asfixia, pero a veces un anclaje insuficiente.

Cualquiera que sea el portainjerto utilizado, la heterogeneidad de las raíces o una escasa profundidad del suelo será perjudicial para un correcto desarrollo de los árboles (Lichou *et al.*, 1990).

La textura y la estructura del suelo

El cerezo exige una buena porosidad de los suelos para la circulación del aire y del agua en el mismo, lo que condiciona el desarrollo de las raíces. Para cada patrón de cerezo la idoneidad de las condiciones de suelo es diferente. En todos los casos, los suelos deben de estar bien drenados. Es preferible una textura ni demasiado arenosa ni demasiado arcillosa que mantenga una buena porosidad, para la circulación del aire y del agua en el mismo, lo que condiciona el desarrollo de las raíces (Lichou *et al.*, 1990).

El cerezo prefiere suelos con buen drenaje, ligeramente calizos, con grava o arena, exposiciones con buena iluminación y aireación. Son idóneos los suelos ricos en materia orgánica y profundos, aunque depende del patrón que se utilice (Ogawa *et al.*, 2000). Los suelos limosos y/o arena limosos son los más adecuados para este frutal ya que en estos suelos se generan poros pequeños que favorecen una buena aireación y aumentan la retención de minerales necesarios para el crecimiento del cultivo (Valenzuela, 1999).

En todos los casos, deben de estar bien drenados y es preferible una textura ni demasiado arenosa ni demasiado arcillosa que mantenga una buena porosidad (Lichou *et al.*, 1990).



6.- Plagas y enfermedades.

6.1.- Plagas

Las plagas descritas en cerezo por García *et al.*, (1994) son las siguientes:

Plagas que afectan a la parte aérea

Entre estas plagas destacan los adultos de *Capnodis tenebrionis*, ya que las larvas dañan el cuello y las raíces principales; el eríofo *Aculus fockeneui* Nat y Treussat; el ácaro rojo de los frutales *Panonychus ulmi* Koch; el tigre del peral, *Stephanitis pyri* Fab.; el chinche del almendro, *Monosteira unicostata* Muls.; los minadores de hoja polípagos, de los cuales parece preferir al cerezo la especie *Lyonetia clerkella* L., aunque también pueden atacarle las especies *Leucoptera malifoliella* O. G. Costa, *Phyllonorycter blancardiella* Fab. y *P. corylifoliella* Hb.; el arañuelo, *Yponomeuta padellus* L. e *Y. malinellus* Zell. que parecen ser la misma especie, aunque con aspecto distinto según se nutran sobre ciruelo ó sobre manzano respectivamente, *Cydia* (= *Grapholita*) *molesta* Busk., que aunque es plaga de melocotonero también se ha visto en peral, y con menor frecuencia en membrillero, albaricoquero, manzano y cerezo, y la polífaga *Cacoecia pronubana* observada también en cerezo.

Plagas que afectan al fruto

En este grupo se encuentran las más difíciles de combatir como son la mosca de la cereza, *Ragoletis cerasi* L., que causa daños parecidos a los de la mosca mediterránea (*Ceratitis*), los gorriones (*Passer montanus*) y estorninos (*Sturnus vulgaris* y *S. unicolor*). Estos últimos son sólo combatibles mediante protección con malla sobre los árboles o con sonidos, bien por explosión de acetileno ó por medio de cintas grabadas con sonidos de pájaros atrapados mezclados con gritos de rapaces, sus enemigos naturales. No en vano el cerezo es el *Prunus avium* ó *Prunus* de las aves y su nombre hace referencia a la voracidad que los pájaros tienen por su fruto.



6.2.- Enfermedades

Los agentes causantes de las enfermedades que pueden afectar al cerezo, son los virus, los fitoplasmas, las bacterias y los hongos.

Virosis

En una prospección en las plantaciones de cerezo en Apulia (Italia), se detectó una contaminación generalizada de las virosis Virus de las manchas anulares necróticas de los prunus (*Prunus necrotic ring spot ilarvirus*, PNRSV), virus del enanismo de los prunus (*Prunus dwarf virus*, PDV), Virus del mosaico del manzano (*Apple mosaic virus*, ApMV) y Virus de las manchas cloróticas de la hoja del manzano (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV). El virus más común en cerezo fue PDV, detectado en el 75% de los cerezos (Savino *et al.*, 1995). No se detectó el Virus de la viruela del ciruelo (*Plum pox virus*, PPV), sinónimo de *Sharka*.

Los síntomas del Virus de la madera estriada del cerezo (*Cherry stem pitting*, CSP) en el tronco del cerezo consisten en un engrosamiento manifiesto de la corteza y en la presencia de tejido medular prominente en el cilindro leñoso. Los árboles afectados pueden eventualmente morir. Las observaciones se realizaron en California en plantaciones comerciales, algunas de las cuales estaban constituidas por la variedad "Bing" injertada sobre varios patrones (Uyemoto *et al.*, 1995).

El Virus de la cereza pequeña (*Little cherry virus*, LCV) se ha expandido y es causa de importantes pérdidas de cosecha en plantaciones de cerezo del norte de Alemania (Harms *et al.*, 1996).

Otro virus descrito en cerezo es el Virus del mosaico estelar de la petunia (*Petunia asteroid mosaic tombusvirus*, PeAMV). La infección a través del suelo representa el medio de dispersión más importante de esta enfermedad vírica que necrosa los extremos de los brotes en el norte de Baviera, Alemania (Pfeilstetter *et al.*, 1996).

Fitoplasmas

Es conocida la virulencia del fitoplasma de la Dureza amarilla del fruto (*Stone fruit yellow*, SFY) sobre algunas selecciones de patrones de cerezo, de los cuales los



menos susceptibles fueron Gisela 3 y F12/1, mientras que Gisela 1, Weihroot 158 y Gisela 5 eran los más afectados (Kison y Seemuller, 2001).

Algunas selecciones de patrones y variedades de cerezo se inocularon con el micoplasma Occidental - X (*Western - X*, X-MLO) y se evaluaron las respuestas de las plantas huésped. La mayor parte de las variedades indexadas eran susceptibles a este organismo, sin embargo, algunos individuos de *P. mahaleb*, *P. maackii*, *P. serotina*, *P. serrulata* y *P. subhirtella* no llegaron a infectarse con X-MLO a pesar de estar sobre patrones infectados (Uyemoto *et al.*, 1991).

Bacterias

El cerezo, como la mayoría de los *Prunus* es huésped natural de *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria del suelo produce tumores en las raíces y es la causante de la enfermedad de la agalla de la corona. Los patrones Gisela 172/9 y Gisela 169/5 parecen ser más sensibles a este tipo de bacteria (Krzyszewska y Azarenco, 1992).

Hongos

Entre los hongos que afectan a la parte aérea podemos encontrar las moniliosis ocasionadas por *Monilia laxa* Ehrenb., que afecta a las flores y por *Monilia fructigena* (Pers.), que afecta a los frutos. *Botrytis cinera* Pers. es causante de la podredumbre gris de los frutos. La antracnosis *Blumeriella jaapii* Rehm. sinónimo de cilindrosporiasis *Cylindrosporium padii* Lib. causa manchas pardas en las hojas que al secarse quedan unos anillos circulares. El cribado o perdigonada *Stigmium carpophila* (Lev.) Evis equivalente a *Coryneum beijerinckii* Oud. también provoca numerosas manchas redondeadas en la superficie de la hoja (Uyemoto *et al.*, <http://www.apsnet.org/online/common/comment/cherry.asp>). En la parte subterránea encontramos hongos que afectan a las raíces provocando podredumbres. El mal blanco es provocado por *Armillaria mellea* (Wahl.) Quel., ó *Armillaria mellea* (Fr.) Karst. y *Rosellinia necatrix* (Hart.) Berl. Ambos hongos producen un telo blanquecino que se observa al levantar la corteza de las raíces. La podredumbre del cuello y de la raíces causada por *Phytophthora mega sperma* y *Phytophthora combivora* comienza por aparecer goma alrededor del tronco y acaba por la asfixia de las raíces (Lichou *et al.*, 1990).



7.- Necesidades de frío para florecer

Durante el invierno, en los climas templados como el de la zona mediterránea, los árboles frutales pasan por un período de reposo invernal, caracterizado porque durante el mismo, la planta no muestra actividad aparente alguna, si bien algunos procesos fisiológicos como la respiración continúan realizándose aunque de forma poco intensa (Melgarejo, 1996). El letargo invernal es un mecanismo desarrollado por los árboles frutales, que crecen en climas con estaciones bien diferenciadas, para evitar el impacto de las bajas temperaturas invernales.

Se denomina necesidades de frío al tiempo durante el cual las plantas deben estar expuestas a bajas temperaturas para lograr una brotación normal en la primavera siguiente. Este concepto tiene tanto un aspecto cuantitativo por depender del tiempo en el cual las plantas están expuestas a las bajas temperaturas, como otro cualitativo ya que dicha acumulación se relaciona con el rango de temperaturas experimentadas (Erez, 1995). Ello significa que con un tiempo a ciertas temperaturas las plantas pueden superar el reposo invernal, pero con otro régimen de tiempo puede no producirse la salida del reposo (Richardson *et al.*, 1974).

El conocimiento de las necesidades de frío de una variedad tiene gran importancia, tanto práctica como económica, en el control, mantenimiento y producción de plantas leñosas (Fennell, 1999) y resulta necesario para poder plantar las variedades de cerezo en las zonas más adecuadas para su cultivo. Una salida incompleta del letargo afecta la fisiología del árbol en tres aspectos principales: retraso de la brotación, una escasa floración y una falta de uniformidad en la brotación y floración (Legave *et al.*, 1982; Gil-Albert, 1989a; Viti y Monteleone, 1991 y 1995; Erez, 2000). Por otro lado, cuando se cultivan variedades con bajas necesidades de frío, es decir variedades de floración precoz, en zonas con inviernos fríos, la floración puede tener lugar demasiado pronto puesto que las necesidades de frío son satisfechas rápidamente. En este caso, las bajas temperaturas posteriores podrían dañar las yemas en su estado fenológico más susceptible, conllevando la posible aparición de anomalías florales (Clanet y Salles, 1972), y la aparición de heladas podría producir importantes pérdidas en los cultivos (Scorza y Okie, 1990).



Las necesidades de frío invernal se han medido tradicionalmente a través del concepto de horas - frío, definiéndose éstas como el número de horas que pasa la planta, durante el período de reposo invernal, a temperaturas inferiores a una umbral comprendida entre 4 y 12 °C para distintos autores y según la especie y ecología de la zona de estudio, siendo frecuente que esta temperatura umbral se fije en 7 °C. Sin embargo, existen numerosos métodos de cálculo desarrollados por distintos autores.

Así, encontramos los métodos aproximados que se basan en fórmulas para estimar las necesidades de frío y entre ellos se encuentran el método de Da Mota, el de Crossa - Raynaud, el de Sharpe o el de Bidadé.

Otro método es el denominado Utah, ideado por Richardson *et al.* (1974) en la Universidad de Utah (E.E.U.U). Este modelo establece que todas las temperaturas no tienen el mismo efecto fisiológico para que los frutales salgan del reposo invernal. Se asigna a cada temperatura o intervalo de temperatura un nivel de eficacia para contribuir a la salida del reposo. Una hora con temperaturas comprendidas entre 2,5 y 9,1 °C equivale a una unidad de frío (máxima eficacia), mientras que las temperaturas comprendidas entre 1,4 - 2,5 °C y entre 9,2 - 15,9 °C tienen un efecto inferior y las superiores a 16 °C contrarrestan unidades de frío acumuladas.

Anteriormente, Erez y Lavee (1971), trabajando en condiciones de temperatura controlada, indicaron que la temperatura más eficiente para la acumulación de frío invernal es de 6 °C y temperaturas de 3 °C y 8 °C tienen la misma eficacia, equivalente al 90 % de la de 6 °C. La temperatura de 10 °C resulta eficaz para la ruptura del reposo, aunque tal eficacia iguala sólo el 50 % de la correspondiente a 6 °C. Mientras que 18 °C no es eficaz en la anulación del frío acumulado, 21 °C tiene un efecto importante siempre que se alterne con las bajas temperaturas en ciclos diarios.

Gilreath y Buchanan (1981) propusieron el modelo de Bajas Necesidades, desarrollado para nectarina en la Universidad de Florida, donde los inviernos son más suaves que en Utah. La máxima efectividad se obtiene para la temperatura de 8° C. El frío acumulado empieza a ser contrarrestado a una temperatura más elevada.

El modelo de Carolina del Norte, ideado por Shaltout y Unrath (1983), es similar al anterior pero incorporando un mayor efecto negativo de las temperaturas superiores a 21 °C. Este modelo fue desarrollado en la Universidad



del estado de Carolina del Norte (E.E.U.U) para variedades de manzano y considera que la máxima efectividad para la salida del reposo invernal se obtiene para la temperatura de 7,2 °C.

El modelo dinámico fue desarrollado por Erez *et al.* (1979a, 1979b) para zonas más cálidas que el modelo de Richardson o Utah y considera la influencia de las temperaturas moderadas que se alternan con éstas durante el período diurno. Erez y Couvillon (1987 y 1988) trabajan reproduciendo artificialmente el ciclo diario natural, estudiando el efecto de la luz y la influencia de las temperaturas moderadas que se producen durante el día en combinación con las temperaturas más bajas que se producen durante la noche. Se combinan distintos ciclos de “temperaturas bajas” con “temperaturas moderadas”.

El cerezo se considera una especie exigente en frío invernal, sus requerimientos deben estar satisfechos para obtener producciones rentables (Couvillon, 1995; Erez, 1995; Tersoglio *et al.*, 2005). Por ello, la falta de frío invernal reduce la velocidad de floración y brotación e incrementa las diferencias del tiempo de floración entre variedades, afectando a la fecundación sobre todo en variedades autoincompatibles por no coincidir la madurez del polen y la receptividad del estigma (Byrne *et al.*, 2003).

En el cerezo, como en los demás frutales de zonas templadas, además de cubrir las necesidades de frío, es necesaria una cierta acumulación de calor para que se produzca la floración. Estos requerimientos de calor se pueden medir en GDHs (Growing Degree Hours). Una GDH se define como una hora a la temperatura de 1 °C por encima de 4,5 °C (Richardson *et al.*, 1975) y se calcula restando 4,5 °C a la temperatura horaria comprendida entre 4,5 °C y 25 °C. Cuando la temperatura supera los 25 °C se estima que la acumulación de esa hora es de 20,5 GDHs. Para calcular las GDHs diarias se toma la media de la temperatura máxima y la mínima de ese día, se le resta 4,5 y se multiplica por 24 (Baskerville y Emin, 1969).

En los últimos años, se han desarrollado nuevas variedades de cerezo adaptadas a distintas condiciones medioambientales. Algunas son de floración temprana o con bajas necesidades de frío, lo que se considera un carácter deseable para alcanzar una buena productividad en la zona mediterránea. En la Región de Murcia el éxito del cultivo del cerezo pasa por la elección de variedades adaptadas a las condiciones climáticas, con inviernos suaves. A pesar del interés del tema se sabe poco acerca de las necesidades de frío de distintas variedades de cerezo.



Tabuenca (1983) calculó las necesidades de frío como horas bajo 7 °C de algunas variedades de cerezo cultivadas en Zaragoza. Mahmood *et al.* (2000) estimaron los requerimientos de frío de tres variedades de cerezo de maduración media o tardía. Sin embargo, no tenemos constancia de que se hayan estudiado las necesidades de calor para florecer en esta especie. Basándonos en los datos de acumulación de frío de varios años en una determinada zona, se podría estimar la probabilidad de satisfacer las necesidades de frío de distintas variedades de cerezo, una vez que éstas se conozcan.

Los objetivos del capítulo I de esa tesis han sido calcular las necesidades de frío para florecer de siete variedades de cerezo durante 2 años en Jumilla (Murcia) utilizando diferentes métodos (el modelo Utah, el modelo dinámico y el modelo de horas bajo 7 °C), así como las necesidades de calor determinadas como GDHs. Con la estimación de las necesidades de frío de cada variedad y el perfil de acumulación de unidades frío en la Región de Murcia durante los últimos 8-12 años se ha determinado la probabilidad de satisfacer las necesidades de frío de cada variedad en función de la altitud.

8.- La flor del cerezo. Aspectos de la biología floral relacionados con la fecundación.

En los cerezos dulces, los botones florales pueden estar aislados en la base de las ramas del año o pueden estar agrupados en las ramas de más años (2 a 5 años). Éstos se agrupan en cada nudo alrededor de una yema de madera y constituyen los ramilletes de mayo.

El botón floral del cerezo comporta generalmente de 2 a 4 flores, lo más frecuente 3. La flor posee 5 pétalos, 5 sépalos, numerosos estambres soldados a su base y un pistilo formado por estigma, estilo y ovario (Saunier *et al.*, 1989a y b). La dehiscencia de las anteras provoca la liberación del polen, efectuándose algunas horas después de la abertura de la flor o antes.

El grano de polen es subesférico, subtriangular, lleva estrías sobre la superficie y posee 3 polos germinativos. Sus dimensiones varían de 32 a 40 µm (Saunier *et al.*, 1989a y b).

Existen diversos factores tales como la receptividad del estigma, la germinación del polen, el crecimiento del tubo polínico o la viabilidad del óvulo que condicionan el éxito de la fecundación y por lo tanto de la obtención de una producción adecuada. Además, la recolección del polen de determinadas



variedades de interés para realizar polinizaciones planificadas es una práctica habitual entre los mejoradores, y es necesario conocer las condiciones adecuadas de conservación del polen para evitar una pérdida de la capacidad de germinación.

Receptividad del estigma.

La receptividad del estigma es efectiva desde la apertura de la flor. Según algunos autores, una concentración elevada de granos de polen en la superficie del estigma ejerce un efecto a nivel bioquímico, que resulta beneficioso para la fecundación (Frediani y Pinzauti, 1981). Esta receptividad es variable y depende de las especies, siendo mayor en especies polinizadas por el viento que en especies polinizadas por insectos (Khadari *et al.*, 1995). Así, el estigma puede ser receptivo mucho más de una hora en *Avena* o *Dactylis* y hasta varios días en otras especies de césped (*Pennisetum* o *Zea*) o *Eucalyptus* en las que puede permanecer receptivo más de una semana en ambientes particularmente hostiles (Heslop-Harrison, 2000).

En las variedades de cerezo 'Summit' y 'Sunburst' se ha puesto de manifiesto el claro efecto de la temperatura sobre la receptividad del estigma, en los tres procesos consecutivos que tienen lugar en las flores de cerezo: la adherencia del polen al estigma, la germinación del polen y la penetración del tubo polínico en el estilo (Hedhly *et al.*, 2003). Mientras que las altas temperaturas (20 ó 30 °C) redujeron la duración de la receptividad del estigma, las bajas temperaturas (10 °C) la alargaron. El efecto negativo de las temperaturas elevadas fue más pronunciado en la germinación del polen y en la penetración de los tubos en el estigma que en la adhesión de los granos.

Germinación del polen y crecimiento del tubo polínico.

La capacidad germinativa del polen es variable entre especies (Stone *et al.*, 1995), distintos genotipos de las mismas especies (Sari-Gorla *et al.*, 1975; Pfahler *et al.*, 1997; Bookman, 1984; Mckee y Richards, 1998; Hormaza y Herrero, 1999; Nikkanen *et al.*, 2000) o incluso entre años para una misma variedad (Nikkanen *et al.*, 2000).

Además, la germinación del polen en la superficie del estigma y la rapidez del crecimiento del tubo polínico dependen en gran medida de las condiciones climáticas. La temperatura óptima se sitúa entre 22 y 25 °C, nivel alcanzado al aire



libre en nuestro clima cuando los cerezos están en flor. En estas condiciones parece que el tubo polínico necesita un mínimo de 2 días para alcanzar el ovario (Bargioni, 1980). Stösser y Anvari, (1990) estudiaron en la variedad 'Buttner' la tasa de crecimiento de los tubos polínicos y la senescencia de los óvulos en función de la temperatura., encontrando que a 20 °C, el tubo polínico alcanzó la base del estilo en 1 ó 2 días. El descenso de temperatura incrementó la longevidad del óvulo, pero disminuyó el crecimiento del tubo polínico, que se paró a 5 °C. El pobre cuajado de los frutos a bajas temperaturas puede explicarse por no alcanzar el tubo polínico al óvulo antes de que éste se degrade.

Hedhly *et al.* (2004) estudiaron el comportamiento del polen de las variedades 'Sunburst' y 'Cristobalina' sometido a 10, 20 y 30 °C en cámaras y en condiciones de campo. El incremento de temperatura redujo la germinación del polen pero aceleró el crecimiento del tubo polínico en las dos variedades, siendo más acusado el incremento en 'Cristobalina'. Sin embargo, el número de tubos en la base del estilo se vio afectado de forma diferente por la temperatura en cada una de las variedades. Mientras que el máximo valor se observó a 10 ó 20 °C en 'Sunburst', en 'Cristobalina' se obtuvo a 30 °C. Los autores indican que debido a las diferencias observadas entre variedades en la dinámica del polen y el efecto de las temperaturas sobre ésta, las temperaturas durante la fase reproductiva podrían actuar como agente selectivo para determinar las variedades mejor adaptadas a un adecuado crecimiento del tubo polínico en el estilo.

Viabilidad del óvulo.

El ovario del cerezo, como el de otras especies de *Prunus*, contiene de partida 2 óvulos, de los cuales uno degenera de 2 a 7 días tras la abertura de la flor.

La madurez del óvulo justo en el momento que abre la flor o antesis es una cuestión de decisiva importancia en el proceso de fecundación en frutales e influye, por lo tanto, directamente en la fructificación obtenida finalmente. El grado de desarrollo del óvulo en antesis es variable entre diferentes especies frutales e incluso entre variedades de la misma especie. Mientras que en algunos trabajos se ha asociado la excesiva madurez del óvulo en antesis con una escasa fructificación (Eaton, 1962; Stösser y Anvari, 1982; Marro, 1976), en otros trabajos se ha señalado el insuficiente desarrollo del óvulo en el momento de la apertura de la flor como el factor responsable de la escasa fructificación (Daubeny *et al.*, 1967; Buttrose y Sedgley, 1979; Albuquerque *et al.*, 2004a). En cerezo variedad



'Satohnishiki' se encontraron sacos embrionarios atrasados a la apertura de la flor (Beppu *et al.*, 1997).

La longevidad del óvulo parece ser un factor limitante para la fecundación. Se ha observado que las temperaturas elevadas durante la floración aceleran la degeneración del óvulo y el cuajado de los frutos de dos variedades estudiadas en dos años diferentes se vio reducido cuando se incrementaron las temperaturas máximas durante el periodo de floración en 5 ó 6 °C (Hedhly *et al.*, 2007). También las altas temperaturas pueden provocar una maduración mucho más rápida y además la degeneración de los óvulos comenzó mucho antes (Eaton, 1959).

Influencia de la temperatura sobre la viabilidad del polen almacenado.

Debido a que la mayoría de las variedades de cerezo son autoincompatibles y a que la época de floración de las variedades de interés para un programa de mejora no suelen coincidir, es necesario utilizar polen seleccionado para realizar cruzamientos dirigidos. Habitualmente se recoge el polen de las variedades deseadas y se seca antes de polinizar manualmente. También es común el intercambio de polen entre mejoradotes, ya que se evitan los periodos de cuarentena. Para garantizar la viabilidad o capacidad de germinación del polen es necesario que se den unas condiciones determinadas de almacenamiento. Mayer *et al.* (1988) encontraron que la capacidad de germinación del polen de cerezo se reducía a la mitad tras 4 horas a 24 °C o 1 hora a 27,7 °C.

Hedhly *et al.* (2005) observaron una fuerte influencia del genotipo y de la temperatura, así como una interacción de estos factores, sobre la germinación *in vitro* del polen cuando se estudió en nueve variedades de cerezo sometidas a 15 ó 30 °C. La temperatura más elevada redujo el porcentaje de germinación del polen obteniendo valores que oscilaron entre un 40% y un 70%. Hormaza y Herrero (1999) también observaron diferencias en la viabilidad de polen entre variedades de cerezo y resultados similares se han obtenido con distintas variedades de otras especies del género *Prunus* como albaricoquero (Egea *et al.*, 1992) y almendro (Martínez-Gómez *et al.*, 2002).

Fogle (1975) y Brown *et al.* (1996) indicaron que congelar o secar y congelar el polen de cerezo retrasa la pérdida de viabilidad cuando éste se almacena durante varios años. Sin embargo, en las variedades 'Black Tartarian' y 'Napoleon' se observó un ligero descenso en la viabilidad del polen almacenado más de 400 días a -18 °C (Griggs *et al.*, 1953). Los resultados contradictorios parecen indicar que el



efecto de largos periodos de almacenamiento a temperaturas de aproximadamente $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ es dependiente del genotipo. La conservación del polen a bajas temperaturas ha sido estudiada en distintas especies. Martínez-Gómez *et al.* (2000) indicaron que el polen de dos variedades de almendro se mantuvo viable durante 8 semanas cuando se conservó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estos resultados se confirmaron posteriormente en otras cuatro variedades diferentes (Martínez-Gómez *et al.*, 2002) y también se observó que las condiciones de almacenamiento a temperaturas bajo $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) no afectaron la germinación del polen después de un año. En un trabajo reciente, Lora *et al.* (2006) encontraron que la germinación del polen de chirimoyo almacenado a -20 , -80 y $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ fue progresivamente reducida con el tiempo de conservación, alcanzando un mínimo tras 90 días de almacenamiento. Sin embargo, tras 30 días no se observaron diferencias en la capacidad de germinación del polen conservado a las tres temperaturas bajo $0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En los últimos años distintos programas de mejora en todo el mundo han dado lugar a nuevas variedades de cerezo. Muchas de estas nuevas variedades se están introduciendo en distintas condiciones climáticas y, especialmente las que son de bajas necesidades de frío, pueden ser interesantes para cultivarlas en zonas de clima mediterráneo.

En el Capítulo II de esta Tesis se estudian por primera vez las condiciones de almacenamiento a largo plazo del polen de algunas selecciones de cerezo obtenidas recientemente de diferentes programas de mejora y de una variedad local. Un método que permita conservar correctamente el polen, manteniendo su viabilidad, puede ayudar a planificar las hibridaciones entre variedades que florecen en distinta época y también proporciona una forma de intercambio de polen entre mejoradores.

9.- Incompatibilidad polen-pistilo.

El cerezo es una de las especies más exigentes en materia de polinización y de fecundación y uno de los principales obstáculos que encuentra el agricultor es la autoincompatibilidad de la casi totalidad de variedades cultivadas hoy día, así como la inter-incompatibilidad entre grupos de variedades determinadas.

La autoincompatibilidad es la incapacidad de una planta angiosperma hermafrodita fértil para producir cigotos después de autopolinización (Heslop-Harrison, 1975). La reacción de incompatibilidad es un mecanismo activo de regulación del crecimiento de los tubos polínicos que, dependiendo de la especie y



del sistema operante, puede ser bloqueado en las etapas iniciales de hidratación del polen y germinación en el estigma (Dickinson, 1995), durante el crecimiento del tubo polínico en el estilo (Heslop-Harrison, 1975) e incluso, posteriormente, en el ovario (Sage *et al.*, 1994).

El rechazo del propio polen antes de la fertilización, permite a las plantas autoincompatibles promover el cruzamiento con otros individuos diferentes, manteniendo así la variabilidad genética. De esta forma se establece un grado de heterocigosis en la población, que es el principal factor que determina la capacidad de respuesta a la selección y por tanto el potencial evolutivo de la especie (Heslop-Harrison, 1975).

Los sistemas de incompatibilidad están ampliamente extendidos en el reino vegetal ocurriendo en más de 3000 especies de 250 géneros que pertenecen a unas 70 familias (Van Gestel, 1976). La autoincompatibilidad puede ser heteromórfica y homomórfica. Las especies que presentan autoincompatibilidad heteromórfica desarrollan flores que difieren en la longitud del estilo y la antera dando lugar a una barrera física contra la autopolinización (Clarke y Newbigin, 1993). Dentro de la autoincompatibilidad homomórfica podemos encontrar dos tipos: esporofítica y gametofítica.

Los sistemas de incompatibilidad esporofítica son aquellos en los que el fenotipo de la planta es determinado por el genoma diploide del progenitor. Las interacciones alélicas de co-dominancia o dominancia/recesividad definen el control genético en estos sistemas que están presentes en las plantas pertenecientes a las familias *Brassicaceae*, *Asteraceae* y *Convolvulaceae*.

En la incompatibilidad gametofítica el fenotipo de la planta vendrá determinado por el genotipo haploide del polen. Este modelo ha sido identificado y ampliamente estudiado en las familias de las *Solanaceas*, *Rosaceas* y *Escropulaceas*, aunque también está presente en otras. Se sabe que en la mayoría de las especies un único locus con múltiples alelos controla el carácter de compatibilidad y se denomina locus S. Entre dos plantas se dará una reacción de incompatibilidad siempre que sus dotaciones alélicas en el locus S no difieran, al menos, en uno de los alelos (McClure y Franklin-Tong, 2006) (Figura 2).

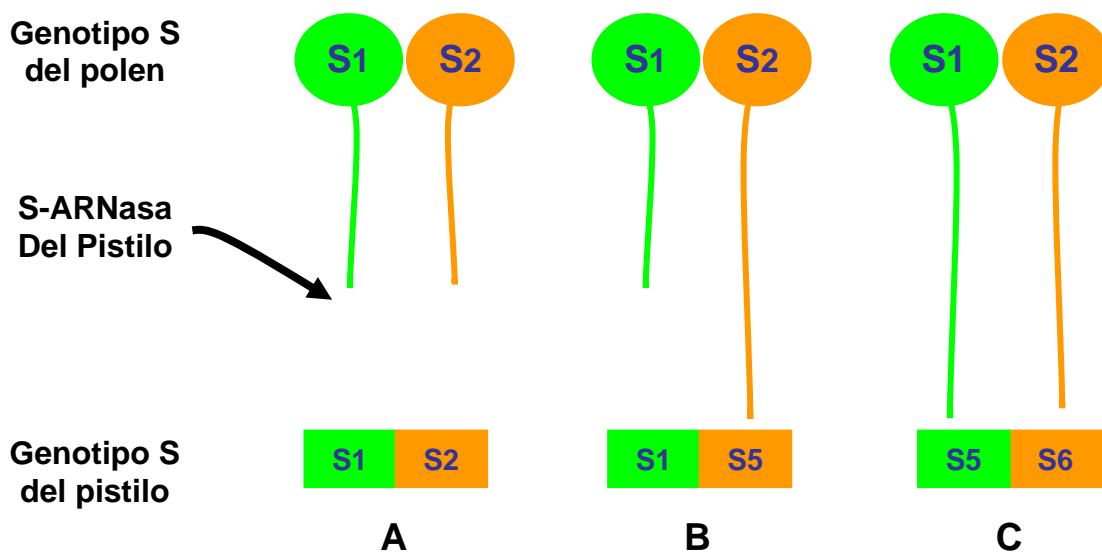


Figura 2. Tipos de cruzamientos según los genotipos del polen y el pistilo en *Prunus*. Incompatible cuando los parentales comparten los dos alelos (A) y compatible cuando los parentales no comparten uno de los alelos (B) o ninguno (C)

El cerezo (*Prunus avium*) fue la primera especie de *Prunus* en la que se describió este modelo (Crane y Brown, 1937) y posteriormente el mismo mecanismo ha sido descrito en otros *Prunus* como el almendro (Dicenta y García, 1993) y el albaricoquero (Burgos *et al.*, 1997). En el locus S hay al menos dos genes implicados en el control del reconocimiento o rechazo específico del polen. Uno se expresa en el pistilo (S-ARNasa, que codifica glicoproteínas con actividad ribonucleasa) (McClure *et al.*, 1989) y otro en el polen (SFB) (Sonneveld *et al.*, 2005).

Los genes S-ARNasas se caracterizan porque son muy polimórficos y se expresan específicamente en el pistilo. Se han identificado y caracterizado en algunas especies de *Prunus* como cerezo (Mau *et al.*, 1982; Boskovic y Tobutt, 1996; Boskovic y Tobutt, 2001), almendro (Boskovic *et al.*, 1997; Tao *et al.*, 1997; Certal *et al.*, 2002), albaricoquero japonés (Tao *et al.*, 2000) y en albaricoquero (Romero *et al.*, 2004).

Los genes candidatos a factor S del polen deben cumplir tres condiciones: estar estrechamente ligados al gen S-RNasa en el locus S, ser muy polimórficos y expresarse específicamente en el polen. La identificación de los genes que codifican proteínas del tipo F-Box como los genes candidatos al factor del polen se ha realizado en distintas especies como *Antirrhinum* (Lai *et al.*, 2002), petunia (Sijacic



et al., 2004), almendro (Entani *et al.*, 2003; Ushijima *et al.*, 2003) o cerezo (Sonneveld *et al.*, 2005).

Desde hace tiempo se ha postulado que la detención del crecimiento de los tubos polínicos se debe a la degradación de su ARN mediante un efecto citotóxico, pero se desconoce como evitan esta toxicidad los tubos polínicos compatibles. Se ha sugerido que la función de los genes F-box ligados al locus S podría ser inactivar las S-ARNasas de genotipo diferente al del pistilo mediante degradación proteolítica y no hacerlo con las del mismo, con lo que se produce el efecto tóxico esperado en los granos de polen incompatibles (McClure y Franklin-Tong, 2006).

A pesar de que el descubrimiento del factor del polen constituye un avance en la comprensión del modelo de incompatibilidad y que se conocen los genes S-ARNasas desde hace más de dos décadas, todavía quedan muchas dudas acerca de la especificidad polen pistilo en frutales.

Hasta finales de los 90, en la determinación del genotipo de autoincompatibilidad en *Prunus* spp. se requería el control de la polinización y la observación del crecimiento de los tubos polínicos en el estilo (Wünsch y Hormaza, 2002). Este método tradicional es lento y es necesario disponer de árboles adultos. Los ensayos de identificación de las ribonucleasas estilares para detectar plantas compatibles es una estrategia alternativa utilizada en almendro (Boskovic *et al.*, 1997), en albaricoquero (Burgos *et al.*, 1998; Alburquerque *et al.*, 2002) y en cerezo (Boskovic y Tobutt, 2001). Sin embargo, la obtención de las proteínas ARNasas estilares y su separación por electroforesis (Sassa *et al.*, 1992) también requiere árboles adultos.

A partir de la clonación, secuenciación y caracterización molecular de los alelos S de cerezo (*Prunus avium* L.) (Tao *et al.*, 1999; Yamane *et al.*, 2000b; Wiersma *et al.*, 2001; Sonneveld *et al.*, 2001 y 2003) es posible disponer de un método más rápido para la identificación de los mismos mediante PCR a partir de cebadores procedentes de secuencias flanqueantes a los dos intrones, ya que su tamaño varía entre los diferentes alelos. Además, en caso necesario, se pueden seleccionar sitios de restricción exclusivos de cada alelo para identificarlos mediante RFLPs (Yamane *et al.*, 2000a) o utilizar sondas de ADNc de los mismos para caracterizarlos empleando también RFLPs (Hauck *et al.*, 2001). Estas técnicas constituyen un método útil para genotipar variedades que se puede aplicar en las primeras etapas de crecimiento de la planta.



Los primeros seis alelos S descritos son suficientes para definir a la mayoría de los grupos autoincompatibles, así como el grupo O al que pertenecen los cerezos que son autoincompatibles, pero que pueden polinizar y ser polinizados por cualquier otro grupo debido a que poseen algún alelo nuevo o una combinación poco frecuente de alelos conocidos (Tao *et al.*, 1999; Yamane *et al.*, 2000a y b; Wiersma *et al.*, 2001; Sonneveld *et al.*, 2001 y 2003; Choi *et al.*, 2002; Wünsch y Hormaza, 2004a).

En la actualidad ya se han identificado hasta 25 alelos. Recientemente, los estudios llevados a cabo por Wünsch y Hormaza (2004b), han permitido determinar los nuevos alelos S₂₃, S₂₄ y S₂₅ de las variedades locales del Valle del Jerte (Extremadura) 'Vittoria', 'Pico Colorado' y 'Taleguera Brillante' mediante análisis por PCR, utilizando cebadores diseñados en las zonas conservadas de los genes S-ARNasas.

La combinación de cebadores específicos permitió la identificación de un putativo nuevo alelo de autoincompatibilidad al que se ha denominado S₂₆, tras haber clonado y secuenciado un fragmento del mismo. Así, se establecen dos nuevos grupos de incompatibilidad formados por S₃S₂₆ y S₆S₂₆, correspondientes a las variedades 'Telegal' y 'Reginal' (Gisbert *et al.*, 2006).

Vaughan *et al.* (2006) han clonado y secuenciado 12 alelos del gen candidato a factor S del polen (SFB) y han desarrollado un método para identificar el genotipo de compatibilidad S de variedades de cerezo basado en el diseño de cebadores que amplifican el primer intrón del gen SFB.

Existen variedades autofértiles que provienen del programa de mejora del *John Innes Centre* de Inglaterra (Lichou *et al.*, 1990; Sonneveld *et al.*, 2001; Wiersma *et al.*, 2001) portadoras de los alelos S₃' ó S₄' y que se clasifican en el grupo SC. Un caso particular es el de la variedad española 'Cristobalina', en la que la autocompatibilidad está ligada al gen S-ARNasa, ya que es portadora del alelo S₃', y también al gen SFB (Wünsch y Hormaza, 2004c).

Actualmente, para el desarrollo de cualquier programa de mejora genética que se base en cruzamientos controlados entre variedades, es necesario conocer previamente la configuración alélica de los cultivares que intervienen en dicho programa. Con estos conocimientos se pueden establecer los grupos de autoincompatibilidad y planificar los cruzamientos de forma adecuada. Particularmente es interesante la introducción de variedades autocompatibles en los cruzamientos y evaluar con las herramientas moleculares disponibles los



descendientes, lo que permite la selección temprana de individuos que sean portadores de alelos de autocompatibilidad.

10.- Evaluación de parámetros relacionados con la biología floral que influyen en la producción del cerezo.

El cerezo fructifica en ramilletes de mayo, los cuales se forman a partir de una yema vegetativa en madera de más de 2 años. Se trata de ramos cortos con todas las yemas de flor arracimadas alrededor de un eje de 3-5 cm de longitud (Agustí, 2004). Los ramilletes de mayo se localizan a lo largo de las ramas principales de 2-3 años. Cada ramillete de mayo contiene un número variable de yemas de flor con una sola yema de madera en la parte terminal para continuar el crecimiento en longitud del mismo y pueden permanecer productivos durante 5-6 años (Lichou *et al.*, 1989). El número de yemas de flor por ramillete varía entre 3 y 7 yemas de flor, pudiendo encontrar ramilletes con 10 yemas de flor según variedad. El número de flores por yema varía entre 1 y 3 flores, llegando incluso hasta tener 9 flores por yema según variedad (Frutos *et al.*, 2008).

En frutales existen numerosos factores relacionados con la biología floral que afectan a la producción, como la densidad de yemas florales, la caída de yemas de flor, la calidad y número de flores y el cuajado de frutos. Aunque es frecuente encontrar producciones escasas en algunas variedades de cerezo, los estudios realizados sobre la biología floral que pueden ayudar a entender las causas de los fallos de producción son escasos.

Se ha estudiado la producción de yemas de flor o 'densidad floral' en algunas variedades de melocotón y nectarina (Bellini y Gianelli, 1975; Okie y Werner, 1996) o en albaricoquero (Alburquerque *et al.*, 2004b; Ruiz y Egea, 2008) encontrando una gran influencia del genotipo sobre este carácter.

Otro factor que puede tener una influencia negativa sobre la producción en frutales es la caída de yemas de flor que se observa en la mayoría de las especies leñosas. Aunque parece que las causas de una elevada caída son diversas (las condiciones climáticas, las necesidades de frío para florecer, heladas, etc.), se ha encontrado que este rasgo es dependiente del genotipo en algunas variedades de albaricoquero (Legave, 1975; Legave *et al.*, 1982; Alburquerque *et al.*, 2004b; Ruíz y Egea, 2008).

Particularmente en el guindo y el cerezo existen determinados componentes, como el número de flores por yema o el número de ramilletes con yemas de flor



por rama, que influyen directamente sobre la producción de frutos (Iezzoni y Mulnix, 1992). Estos autores observaron una gran variabilidad en el número de yemas de flor por ramillete cuando estudiaron una colección de plantas de guindo.

El cuajado, expresado como el porcentaje de flores que llegan a ser frutos, es variable y depende tanto de la variedad como de las condiciones ambientales en el momento de la floración, de la presencia de insectos polinizadores, del estado nutricional del árbol, así como del número de polinizadores intercalados en la plantación y de la distancia de los mismos (Roversi y Ughini, 1985).

La caída temprana de flores es un proceso normal en muchas especies (Guitian, 1993), ya que disminuye el cuajado de frutos, expresado como el porcentaje de flores que llegan a ser frutos, y por lo tanto la producción final en frutales. La influencia de distintos factores, como las condiciones climáticas o el genotipo, sobre el cuajado se ha estudiado en diferentes frutales incluido el cerezo (Caprio y Quamme, 1998; Hedhly *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2004b; Choi y Andersen, 2001).

En distintos trabajos se ha examinado la influencia de las condiciones climáticas en floración sobre el cuajado indicando que tanto las bajas temperaturas como las elevadas tienen un efecto negativo. Así, se sabe que a bajas temperaturas se ralentiza el crecimiento del tubo polínico y se puede acortar el periodo de polinización efectivo (Sanzol y Herrero, 2001). También se ha observado una disminución de la viabilidad del óvulo y de la efectividad de la polinización cuando las temperaturas previas a la floración eran elevadas (≥ 27 °C) indicando estos factores como posibles causas de fallos de producción en manzano (Caprio y Quamme, 1998).

La variabilidad observada entre años y diferentes variedades de cerezo por Choi y Andersen (2001) indica que hay una gran influencia de las condiciones climáticas y del genotipo sobre el cuajado de frutos. Resultados similares se han encontrado en otras especies como peral (Atkinson y Taylor, 1994; Atkinson y Lucas, 1996) o albaricoquero (Albuquerque *et al.*, 2004a; Ruiz y Egea, 2008).

Los frutos dobles en cerezo se forman por la fecundación de dos carpelos pertenecientes a la misma flor. Uno de ellos se desarrolla más que el otro dando lugar a un fruto doble, poco o nada comercial. La presencia de frutos dobles devalúa la producción del cerezo. Las causas vinculadas a la aparición de frutos dobles no están claras. En un estudio realizado con la variedad 'Satohnishiki' se ha relacionado la producción de frutos dobles con elevadas temperaturas registradas



durante el verano, cuando tiene lugar la diferenciación de sépalos y pétalos (Beppu *et al.*, 2001). Frutos *et al.* (2008) indican que la producción de frutos dobles es independiente de la orientación de éstos en el árbol y es un carácter dependiente del genotipo e influenciado por las temperaturas cálidas durante la fase de diferenciación floral.

El interés de los mejoradores es diverso, pero el conocimiento de distintos aspectos de la biología floral de diferentes variedades puede ayudar a elegir las variedades más apropiadas para cultivar en una determinada zona y emplearlas como parentales en un programa de mejora buscando adaptación a unas determinadas condiciones climáticas.

En el capítulo III de esta Tesis se han estudiado distintos parámetros de la biología floral en siete variedades de cerezo representativas de las distintas fechas de floración, tratando de caracterizarlas y de establecer la influencia de los parámetros florales sobre la productividad.

11. Calidad del fruto.

El concepto de calidad de un fruto es un término subjetivo, ya que depende de las preferencias del consumidor, influenciada además por el entorno socio-económico en el que se encuentra. No obstante, de forma general se puede afirmar que en el caso de la cereza las principales características que determinan su calidad son: tamaño del fruto, color, firmeza, dulzor, acidez y aroma así como el color verde y la turgencia del pedúnculo (Romano *et al.*, 2006).

La cereza es un fruto muy apreciado por los consumidores, debido a que es uno de los primeros frutos de la primavera y a su excelente calidad, que viene determinada fundamentalmente por los siguientes atributos o cualidades:

El color de la piel se considera el índice más importante de calidad y estado de maduración de la cereza (Gao y Mazza, 1995) y depende del contenido en antocianinas, que oscila entre 10 y 700 mg/100 g según la variedad (Wang *et al.*, 1997) y de la concentración relativa de las diferentes antocianinas (Mozetič *et al.*, 2004; Serrano *et al.*, 2009).

El sabor dulce se debe fundamentalmente al contenido en glucosa y fructosa y en menor medida a sacarosa y sorbitol (Girard y Kopp, 1998; Esti *et al.*, 2002; Serrano *et al.*, 2005a; Usenik *et al.*, 2008) y suele ser más elevado que en otros frutos de hueso. Este contenido de azúcares varía de unas variedades a otras, entre 11 y



25 °Brix en el estado de maduración comercial (Girard y Kopp, 1998; Esti *et al.*, 2002; Serrano *et al.*, 2005a y b; Díaz-Mula *et al.*, 2009).

La acidez también depende de las variedades, con valores entre 0.4 y 1.56 g/100 g en el estado de maduración comercial, aunque a diferencia de lo que ocurre en otros frutos, en el caso de las cerezas la acidez aumenta durante la maduración en el árbol (Drake y Elfving, 2002; Serrano *et al.*, 2005a; Díaz-Mula *et al.*, 2009). Esta acidez, al igual que ocurre en otras especies del género *Prunus*, como ciruela, melocotón, albaricoque y nectarina se debe fundamentalmente al ácido málico (Crisosto, 1994; Girard y Kopp, 1998; Zuzunaga *et al.*, 2001; Serrano *et al.*, 2005a; Usenik *et al.*, 2008).

En estudios realizados con un numeroso panel de catadores entrenados se ha demostrado que el grado de aceptación de las cerezas viene determinada fundamentalmente por el color, los sólidos solubles totales (SST), que refleja el contenido en azúcares, y la relación SST/acidez (Crisosto *et al.*, 2002 y 2003).

La firmeza también es un atributo importante de calidad muy apreciado por los consumidores y directamente relacionado con el potencial de conservación post-recolección, y con la mayor resistencia a las podredumbres y a los daños mecánicos, aunque existen diferencias genóticas importantes (Díaz-Mula *et al.*, 2009). En algunos trabajos se ha relacionado la precocidad de los cultivares con la firmeza, siendo los cultivares tardíos más firmes que los tempranos, aunque también se han encontrado cultivares tempranos con valores intermedios de firmeza y cultivares de media estación con una firmeza muy baja (Chistesén, 1995; Esti *et al.*, 2002; Díaz-Mula *et al.*, 2009). En cualquier caso, todos los estudios realizados muestran que la firmeza incrementa durante el proceso de crecimiento de la cereza en el árbol, alcanzando valores máximos en la segunda fase de crecimiento del fruto, coincidiendo con la lignificación del endocarpo y que posteriormente la firmeza disminuye de forma acusada, lo que refleja simplemente el aumento del tamaño de las células del mesocarpo, mientras que el ablandamiento en los últimos días del desarrollo se debe a la degradación parcial de los componentes de la pared celular, que en este fruto se debe fundamentalmente a un aumento en la actividad del enzima β -galactosidasa (Barret y González, 1994; Batisse *et al.*, 1996; Gerardi *et al.*, 2001; Muskovics *et al.*, 2006; Díaz-Mula *et al.*, 2009).

El aroma se desarrolla en la fase de maduración debido a la síntesis de compuestos volátiles. Concretamente, se ha comprobado que el ácido acético y



algunos aldehídos, como benzaldehído, E-2-hexenal y hexanal son los compuestos volátiles mayoritarios en las cerezas recién recolectadas de la variedad “Bing” y los tres últimos los responsables del flavor de estos frutos (Mattheis *et al.*, 1997). También es importante el verdor y frescura del pedúnculo y la ausencia de daños y defectos en el fruto.

Actualmente, y especialmente en los países desarrollados, los frutos y hortalizas se consumen no sólo por sus propiedades organolépticas y nutritivas sino también por los beneficios que aportan a la salud. De hecho, numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que existe una relación inversa entre el consumo de frutas y hortalizas y la incidencia de varias enfermedades degenerativas como enfermedades cardiovasculares, cataratas, Alzheimer, diversos tipos de cáncer, etc., debido a la presencia en estos productos vegetales de diversos compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes (Khris-Etherton *et al.*, 2002; Scalbert *et al.*, 2005; Schreiner y Huyskens-Keil, 2006). Entre estos compuestos se incluyen las vitaminas A, C y E, los carotenoides y los compuestos fenólicos, en los que encuentran las antocianinas (Kaur y Kapoor, 2001; Tomás-Barberán y Espín, 2001). De forma general, se puede afirmar que existen diferencias importantes entre distintos cultivares de cereza en su contenido en compuestos bioactivos, al igual que en los parámetros relacionados con la calidad organoléptica y nutritiva (Girard y Kopp, 1998; Gonçalves *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Usenik *et al.*, 2008; Díaz-Mula *et al.*, 2009).

Durante la maduración de la cereza en el árbol se producen una serie de cambios bioquímicos: incremento de los azúcares, solubilización de las sustancias pécticas y ablandamiento de los tejidos, incremento del tamaño del fruto, degradación de la clorofila, síntesis de antocianinas, etc. Todos estos cambios dan lugar a que los frutos adquieran las características organolépticas apreciadas por el consumidor. Por tanto la recolección de los frutos debe realizarse en el momento en que estas características sean las más apreciadas, y al mismo tiempo permitan que el producto disponga de la vida útil necesaria para su comercialización.

El proceso de maduración de la cereza en el árbol se puede seguir por los cambios de color de verde a rojo más o menos intenso dependiendo de la variedad, los cuales se pueden cuantificar mediante los parámetros L^* , a^* y b^* y los índices de color Croma y Hue obtenidos con un colorímetro portátil. No obstante, en la agricultura normalmente se utilizan cartas de color, siendo la más usada la del Centre Technique Interprofessionnel de Fruits et Légumes (CTIFL, Paris), que



para las cerezas establece una escala de color rojo de 1 a 5, con un valor característico para cada variedad en su estado de maduración apropiado para la recolección comercial. Así, el color rojo característico de las distintas variedades de cereza se usa como indicador del estado de maduración y también de la calidad, ya que normalmente éste se alcanza cuando el fruto ha alcanzado su tamaño definitivo y un contenido elevado en azúcares (Crisosto *et al.*, 2002; Mozetič *et al.*, 2004; Usenik *et al.*, 2005; Muskovics *et al.*, 2006; Díaz-Mula *et al.*, 2009). Existe una gran diferencia en el contenido en antocianinas totales en las diferentes variedades de cereza estudiadas, aunque en todas ellas las antocianinas predominantes son cianidin 3-rutinósido y cianidín-3-glucósido, seguidas de pelargonidín-3-rutinósido, mientras que peonidín- y pelargonidín-3-glucósido y peonidín-3-rutinósido se han encontrado a concentraciones mucho más bajas (Gonçalves *et al.*, 2004; Mozetič *et al.*, 2004 y 2006; Chaovanalikit y Wrolstad, 2004; Usenik *et al.*, 2008; Serrano *et al.*, 2009).

Las cerezas deben madurar en el árbol, y si la recolección se realiza cuando la fruta está excesivamente verde, no alcanzará sus características organolépticas óptimas (firmeza, color y tamaño), valor nutricional (azúcares y ácidos orgánicos) ni propiedades funcionales (fenoles, vitaminas y capacidad antioxidante) elevadas, de manera que proporcionen los beneficios para la salud asociados a su consumo. Por otra parte, la cereza recolectada excesivamente madura no es capaz de soportar el transporte y la manipulación, produciéndose sobremaduración y podredumbres que llevarán a una pérdida de su calidad comercial.

En el capítulo III de esta Tesis, junto con los distintos parámetros de la biología floral, se determinaron en siete variedades de cerezo representativas de las distintas fechas de floración, algunos parámetros relacionados con la calidad de las cerezas, como peso, color, sólidos solubles, acidez total y firmeza. Este análisis se realizó en diferentes estados a lo largo del proceso de crecimiento y maduración de la cereza en el árbol, con el fin de determinar el momento óptimo de recolección en el que cada variedad presenta su máxima calidad, de acuerdo con sus propiedades organolépticas y nutritivas.



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El cultivo del cerezo presenta una serie de ventajas frente a otros cultivos frutales, ya que sus requerimientos de agua y abono nitrogenado son menores, con las consiguientes ventajas de protección del medioambiente. Por otra parte, la climatología del sureste español, disponiendo de las variedades adecuadas, permite la entrada en producción con una precocidad que es difícilmente igualada por otras regiones españolas y muy por delante de las regiones productoras en Europa. Esto permitiría que las empresas exportadoras de Región de Murcia explotaran un nuevo producto, aprovechando la ventaja comercial de las primeras cerezas del mercado. Es de destacar la rentabilidad del cultivo en pequeñas explotaciones de tipo familiar y la importante necesidad de mano de obra en la recolección cuando otros cultivos frutales no la demandan.

Por tanto, el cultivo del cerezo puede suponer una alternativa al cultivo del albaricoquero, muy importante en la Región de Murcia, y podría tener un gran impacto en la mejora de infraestructuras, ya que las empresas que basan su economía en la comercialización de fruta podrían ampliar su calendario de trabajo y desarrollar nuevas líneas de confección y expedición de cereza utilizando los canales comerciales ya existentes. Otra ventaja que presenta el cerezo es su tolerancia a Plum Pox Virus (Sharka), de gran impacto en albaricoquero y en ciruelo.

Por todo lo anteriormente expuesto creemos que se justifica el gran interés del cerezo para la Región de Murcia y la necesidad estudiar los materiales vegetales que pudieran ser apropiados para su cultivo en nuestras condiciones climáticas. Por lo tanto, el objetivo principal de esta tesis consiste en estudiar y analizar una serie de parámetros para obtener información acerca del comportamiento de algunas variedades de cerezo cultivadas en la Región de Murcia. La tesis se ha estructurado en diferentes capítulos en función de los objetivos específicos planteados.

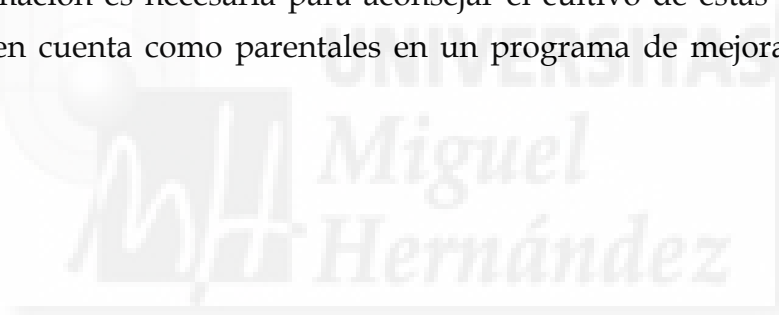
En el capítulo I se han determinado las necesidades de frío para florecer de siete variedades de cerezo durante 2 años en Jumilla (Murcia) utilizando diferentes métodos (el modelo UTAH, el modelo dinámico y el modelo de horas bajo 7 °C), así como las necesidades de calor determinadas como GDHs.



En el Capítulo II de esta Tesis se estudian por primera vez las condiciones de almacenamiento a largo plazo del polen de algunas selecciones de cerezo dulce obtenidas recientemente de diferentes programas de mejora y de una variedad local.

En el capítulo III de esta Tesis se han estudiado distintos parámetros de la biología floral en siete variedades de cerezo representativas de las distintas fechas de floración, tratando de caracterizarlas y establecer la influencia de los parámetros sobre la productividad. También se determinaron algunos parámetros relacionados con la calidad de las cerezas, como peso, color, sólidos solubles, acidez total y firmeza. Este análisis se realizó en diferentes estados a lo largo del proceso de crecimiento y maduración de la cereza en el árbol, con el fin de determinar el momento óptimo de recolección en el que cada variedad presenta su máxima calidad, de acuerdo con sus propiedades organolépticas y nutritivas.

Esta información es necesaria para aconsejar el cultivo de estas variedades o para tenerlas en cuenta como parentales en un programa de mejora genética de cerezo dulce.





CAPITULO I

Chilling and heat requirements of sweet cherry cultivars and the relationship between altitude and the probability of satisfying the chill requirements.

Alburquerque, N., García-Montiel, F., Carrillo, A., Burgos, L. (2008). *Environmental and Experimental Botany*, **64(2)**: 162-170.



Abstract

Sweet cherry cultivars have different chilling and heat requirements for breaking rest and flowering. The knowledge of these requirements may be valuable in the selection of the appropriate cultivars for producers and to avoid losses caused by an inadequate cultivar selection in a particular area. Determination of chilling and heat requirements is also important within a breeding programme, when choosing parents to obtain early-flowering cultivars. Chilling requirements of seven cherry cultivars growing in South-eastern Spain were calculated using different methods (hours below 7 °C, Utah and Dynamic model), which were compared. Recording hourly average temperatures at several locations during two years, the Utah and Dynamic models performed better than hours below 7 °C. Different chilling requirements and slight differences in heat requirements were observed in the studied cultivars. 'Cristobalina' and 'Brooks', the earlier-flowering cultivars, were those with the lowest chilling requirements. 'Burlat', 'New Star' and 'Somerset' had medium chilling and heat requirements for flowering, and 'Marvin' showed the highest values and also the latest blooming date. All the studied cultivars may have their chilling requirements satisfied in the region of Murcia, if grown at least 650 metres above sea level. Some cultivars, such as 'Cristobalina' and 'Brooks', could successfully break dormancy only when grown at an altitude above 325 m.

Keywords: dormancy, Dynamic model, flowering, GDH, hours-below-7 °C model, *Prunus avium* L., Utah model.



1. Introduction

A specific knowledge of the influence of climatic conditions on the phenology of cultivated temperate fruits allows farmers to obtain an adequate productivity. Deciduous fruit trees and other woody perennials of temperate climates require a certain amount of winter chilling to overcome their dormancy. Once the chilling requirements have been satisfied, heat is also required to reach full bloom. The lack of chilling reduces vegetative growth and yield (Erez and Couvillon, 1987; Erez, 2000). Temperate fruits are grown and many different environmental conditions and studies concerning chilling and heat requirements of different cultivars are valuable tools to avoid incomplete breaking of dormancy or abnormal flowering.

Various models have been developed to measure the accumulation of winter chilling in deciduous fruit-growing areas: the Utah method (Richardson *et al.*, 1974); low-requirements method (Gilreath and Buchanan, 1981); Aron method (Aron, 1983); Dynamic method (Erez *et al.*, 1979a, 1979b); etc. However, studies on heat requirements are fewer and the effects on flowering are not well known (Couvillon and Erez, 1985; Citadin *et al.*, 2001; Gariglio *et al.*, 2006).

Traditionally, hours below 7 °C or chilling hours (CH) have been used as the measure of chilling for fruit trees (Weinberger, 1950). The Utah model, proposed by Richardson *et al.* (1974), is used particularly in cooler areas of temperate zones (Dennis, 2003). This method quantifies the degree of accumulated chilling in chill units (CU). Positive and negative hourly values are accumulated at different rates for each temperature range. Then, net values are added to obtain a specific chill units accumulation (Richardson *et al.*, 1974). According to this method, the initial date for CU calculation begins when chilling is consistent and high temperatures are rare (Erez *et al.*, 1979a).

The Dynamic model was proposed by Erez and Couvillon (1987) and was developed for warmer areas than the Utah model. Breakage of dormancy occurs in two steps, the first being reversible and the second irreversible, and chilling requirements are calculated as chilling portions (CP). As for the Utah model, temperatures have different effects on dormancy. There is also a negative influence of high temperatures, but temperature ranges differ in the two models.



Like other temperate fruits, sweet cherry has chilling and heat requirements for flowering. In recent years, many new sweet cherry cultivars have been released and grown in different environmental conditions. Some of them are early flowering, which is a desirable character in Mediterranean areas to obtain early yield. Although the South-East of Spain is an important fruit-producing area, sweet cherry is not a traditional fruit crop in the region of Murcia. However, nothing prevents this species from being cultivated in different areas of Murcia with excellent results, if appropriate varieties are chosen.

Little is known about the chilling requirements of sweet cherry. Tabuenca (1983) determined the chilling requirements of some sweet cherry cultivars growing in Zaragoza (Spain), calculated as hours below 7 °C. Mahmood *et al.* (2000) studied the chilling requirements of three medium-late-ripening sweet cherry cultivars, estimating the chilling needs for each one. However, as far as we know, heat requirements have not been studied in this species.

A consistent and predictable winter chilling accumulation in a particular area is more desirable than year-to-year variability. Knowledge of the chilling accumulation based on several years' data would allow estimation of the probability of satisfying the chilling requirements of sweet cherry cultivars in a given area.

The main goals of this work were to calculate the chilling requirements for breaking the dormancy of seven sweet cherry cultivars, using different methods (the hours below 7 °C, Utah and Dynamic models), and to determine the heat requirements for flowering in South-eastern Spain. With the estimated chilling requirements and the knowledge of the chill accumulation profile in this region during the last 8-12 years, the probability of satisfying chill requirements in relation to the altitude was determined for the sweet cherry cultivars studied in this work. This information can be used to advise sweet cherry farmers about which cultivars are best suited to their area and which areas of our region are the most appropriate for sweet cherry production.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The sweet cherry cultivars assayed were 'Cristobalina' (Spain), 'Brooks', 'Ruby' and 'Marvin' (California-USA), 'Burlat' (France), 'New Star' (Canada) and



'Somerset' (New York-USA). The cultivars were chosen because they span the range of flowering time in sweet cherry. All of them were cultivated in Murcia (South-East Spain) under a Mediterranean climate. Most of the cultivars were grown in an experimental field located at Jumilla (see Table 1: station JU12 and Figure 1), with the exception of 'Cristobalina', which was grown in a private orchard located at Abarán (see Table 1: station CI22 and Figure 1). All trees were grafted on 'SL-64' (*Prunus mahaleb* L.) rootstock..

2.2. Determination of chilling and heat requirements

The chilling requirements necessary for breaking the dormancy of each cultivar were calculated in the field as CH (Weinberger, 1950), CU from the Utah method (Richardson *et al.*, 1974) or CP from the Dynamic model (Erez and Couvillon, 1987).

Heat requirements were calculated as growing degree hours (GDH). GDHs are hourly average temperatures (°C) minus 4.5 °C, accumulated daily (Richardson *et al.*, 1974). For each cultivar, heat requirements were calculated as the number of GDHs accumulated between the end of dormancy and the date when 50% of flowers were open (F⁵⁰). Both chilling and heat requirements were determined during two consecutive years (2004-2006).

Hourly temperatures were provided by 'Servicio de Información Agraria de Murcia' (S.I.A.M.; <http://www.carm.es/cagr/cida/indexsiam.html>). The meteorological stations were located in the experimental field (Jumilla station, code JU12, see Table 1) and very close to the private orchard (Abarán station, code CI22, see Table 1). Table 2 shows maximum and minimum monthly temperatures and rainfall during the autumn-winter season at the sampling sites.

The geographical characteristics of 42 meteorological stations distributed throughout the region of Murcia and the average CU (Utah method) for the data of 8 to 12 years \pm standard error are shown in Table 1.

**Table 1.** Geographical characteristics and average chill units \pm standard error, from data of 8 to 12 years in 42 weather stations in Murcia (South-eastern Spain).

Nº	Station	County	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Chill Unit \pm SE
1	AL31	Totana	37° 43' 59" N	1° 30' 43" W	296	1033 \pm 74
2	AL41	Alhama	37° 48' 12" N	1° 4' 0" W	170	774 \pm 36
3	AL51	Librilla	37° 54' 4" N	1° 20' 13" W	245	929 \pm 64
4	AL62	Mazarrón	37° 32' 0" N	1° 23' 0" W	15	335 \pm 48
5	CR12	Caravaca	38° 2' 0" N	1° 75' 0" W	880	1238 \pm 42
6	CR32	Cehegin	38° 3' 0" N	1° 40' 0" W	624	903 \pm 35
7	CR42	Moratalla	38° 11' 53" N	1° 48' 43" W	466	1158 \pm 41
8	CR52	Cehegin	38° 3' 0" N	1° 51' 0" W	527	1086 \pm 28
9	CA21	Murcia	37° 50' 13" N	1° 7' 41" W	120	904 \pm 74
10	CA42	Fuente Alamo	37° 45' 0" N	1° 7' 41" W	90	843 \pm 58
11	CA52	Cartagena	37° 40' 52" N	1° 4' 1" W	120	765 \pm 74
12	CA72	Cartagena	37° 37' 48" N	0° 54' 58" W	70	794 \pm 67
13	CA91	Fuente Alamo	37° 41' 56" N	1° 14' 17" W	175	794 \pm 49
14	CI22	Abarán	38° 14' 1" N	1° 18' 21" W	270	867 \pm 51
15	CI32	Ulea	38° 11' 28" N	1° 15' 14" W	306	995 \pm 72
16	CI42	Cieza	38° 16' 79" N	1° 27' 79" W	241	889 \pm 40
17	CI52	Calasparra	38° 15' 33" N	1° 43' 47" W	290	936 \pm 23
18	JU12	Jumilla	38° 23' 40" N	1° 25' 30" W	360	1223 \pm 34
19	JU42	Yecla	38° 39' 36" N	1° 10' 55" W	661	1323 \pm 68
20	JU52	Yecla	38° 33' 45" N	1° 6' 15" W	690	1164 \pm 37
21	JU61	Jumilla	38° 28' 0" N	1° 19' 0" W	525	987 \pm 46
22	JU71	Jumilla	38° 34' 0" N	1° 14' 0" W	400	957 \pm 34
23	JU81	Jumilla	38° 20' 0" N	1° 19' 0" W	420	989 \pm 43
24	LO11	Lorca	37° 36' 11" N	1° 37' 1" W	330	1061 \pm 72
25	LO21	Lorca	37° 30' 25" N	1° 41' 42" W	382	1172 \pm 69
26	LO31	Aguilas	37° 25' 12" N	1° 35' 28" W	25	507 \pm 57
27	LO41	Lorca	37° 51' 40" N	1° 49' 41" W	697	1298 \pm 60
28	LO51	Aguilas	37° 29' 33" N	1° 37' 40" W	180	723 \pm 60
29	LO61	Pto. Lumbreras	37° 35' 5" N	1° 42' 44" W	450	890 \pm 32
30		Torres de Cotillas	38° 0' 50" N	1° 17' 20" W	169	830 \pm 77
31	MO12	Molina Segura	38° 7' 2" N	1° 11' 57" W	150	765 \pm 54
32	MO22	Molina Segura	38° 4' 0" N	1° 14' 0" W	180	791 \pm 33
33	MO31	Abanilla	38° 10' 5" N	0° 2' 56" W	151	919 \pm 100
34	MO41	Fortuna	38° 9' 58" N	1° 8' 53" W	240	839 \pm 76
35	MO51	Ojos	38° 7' 41" N	1° 19' 52" W	195	652 \pm 84
36	MO61					
36	ML12	Yechar	38° 0' 0" N	1° 3' 0" W	320	876 \pm 55
37	ML21	Mula	38° 0' 0" N	1° 3' 0" W	320	697 \pm 81
38	MU21	Beniel	38° 2' 7" N	1° 0' 28" W	56	888 \pm 78
39	MU31	Murcia	37° 53' 0" N	1° 16' 0" W	150	573 \pm 78
40	MU52	Murcia	37° 57' 47" N	1° 0' 0" W	210	675 \pm 52
41	MU62	Murcia	37° 56' 24" N	1° 8' 5" O	140	853 \pm 90
42	TP81	Murcia	37° 48' 22" N	1° 2' 38" O	153	973 \pm 87

With the data from all years, the probability that chilling requirements would be satisfied was calculated as the percentage of years with enough CU in each station to satisfy the chilling requirements of every studied cultivars. This probability was correlated with the altitude of each station.

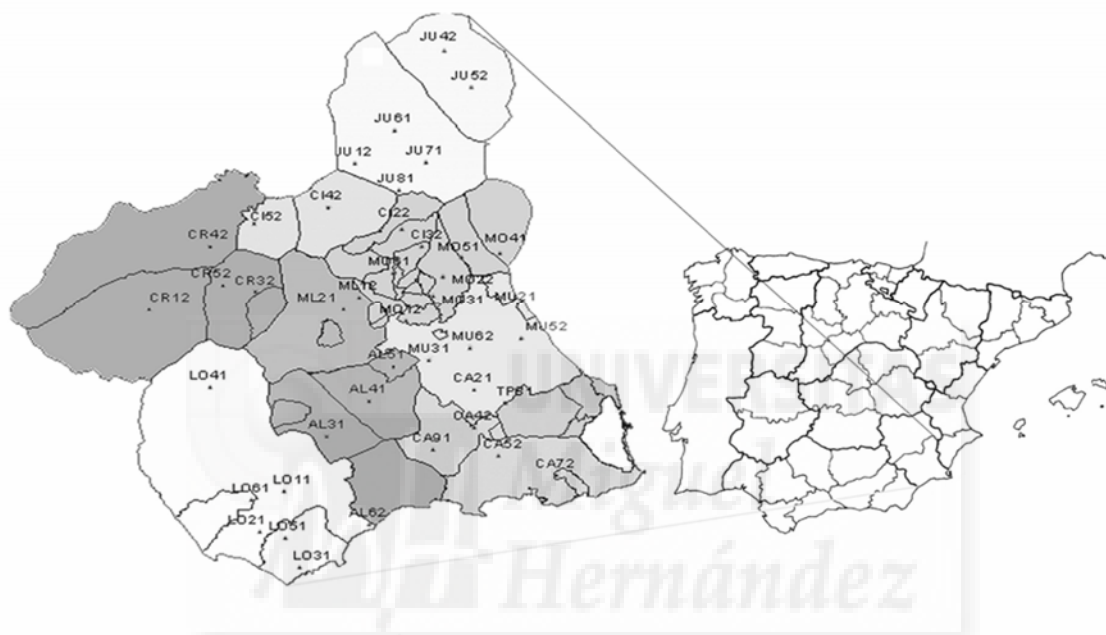


Figure 1. The location of Murcia in Spain (latitude $38^{\circ} 45'$ and $37^{\circ} 23'$ North; longitude $0^{\circ} 41'$ and $2^{\circ} 21'$ West) and the meteorological stations distributed in the Region.

2.3. Experimental design

During the two years of the study, four branches of each cultivar (30-cm length and 5-mm diameter, approximately) were collected periodically from different trees. The first sample was taken on December 15th and new branches were collected when approximately 100 additional CU had accumulated. Sample collection was more frequent (approximately every 50 CU accumulated) when the accumulated chill became close to the expected value (in most cases from the 3rd collection) until the middle of February.

In the laboratory, the bases of the branches were placed in a 5%-sucrose solution, in a growth chamber under controlled conditions (24 ± 1 °C, $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, under cool white fluorescent tubes, and 70% relative humidity). After 10 days in the growth chamber, the phenological stage of the flower buds was tested using the methodology proposed by Baggiolini (1952). The date for breaking of dormancy was established when 40-50% of flower buds were at the advanced Baggiolini stage B (showing petals, Figure 2) or at the phenological growth stage 55 according to the international BBCH scale (Meier *et al.*, 1994).

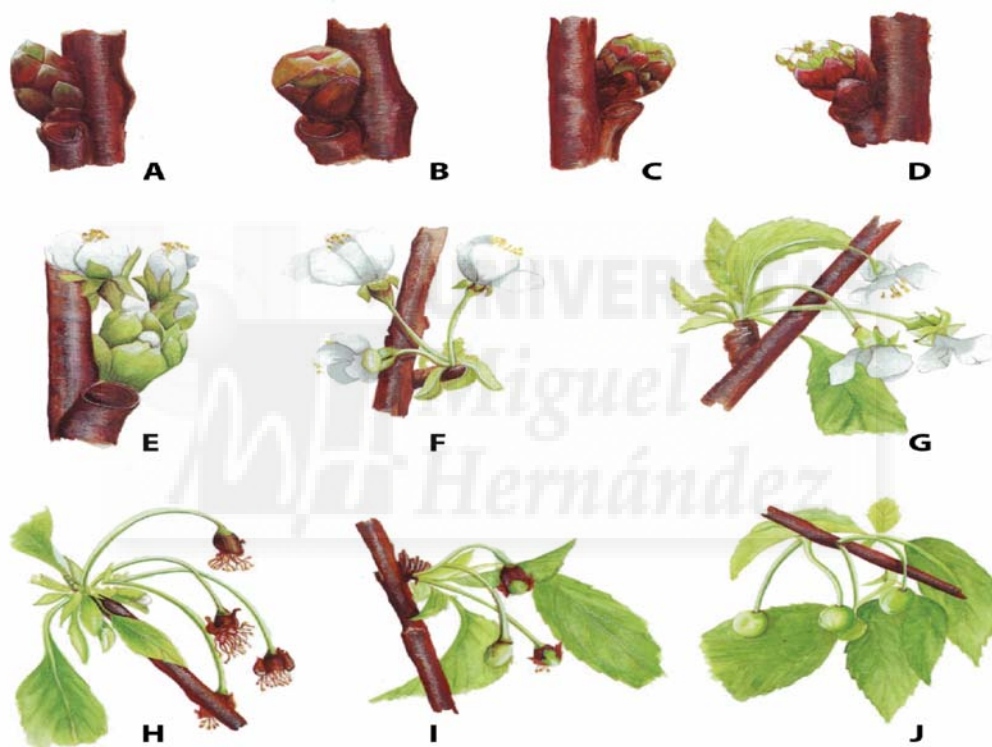


Figure 2. Phenological growth stages during flowering of sweet cherry according to Baggiolini (1952). Modified from Lichou *et al.* (1990).

Additionally, the weight of the flower buds was recorded after 10 days in the growth chamber. Rest was considered finished when the weight of 20 flower buds increased by at least 20% compared with the previous sampling (Guerriero *et al.*, 2002).



2.4. Statistical analysis

Chilling and heat requirements data (CH, CU, CP and GDHs) were subjected to analysis of variance (ANOVA), with cultivar, year and model as sources of variation to estimate chilling requirements. Means were separated by LSD (0.05). R squared and the linear regression function were employed to determine the most suitable model for chilling accumulation and the correlation between average CU (Utah model), over 8 to 12 years, and the altitude of the meteorological station. All analyses were performed with the SPSS software package v. 11.0 for Windows.

3. Results

Weather data and CH, CU or CP accumulation during two consecutive years at the experimental sites are presented in Table 2. The chilling accumulation period in Murcia begins in November, considering the first day of this period as the one after the last negative accumulation (Richardson *et al.*, 1974).

The Abarán station is at a lower altitude and is warmer than Jumilla, with less average chill accumulation, calculated from at least 8 years data and by different methods (Table 1). In accordance with this, the location had a strong influence on the accumulated chill during 2005 and 2006 ($P < 0.001$) while the year did not have any effect. Chilling values calculated by the three methods for the whole period studied differed ($P < 0.001$) (Table 2). The interactions model-year and model-location were significant ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively). These differences are due mainly to the results from the hours-below-7 °C model, which varied greatly between years and locations.

The increase in flower bud fresh weight recorded during the first year of the experiment is shown in Figure 3. The observed increase coincided with the point when more than 50% of the flower buds were at the advanced Baggiolini B stage, after 10 days at 24°C for all cultivars with the exception of 'Ruby'.

For this cultivar, an increase of flower bud weight was observed between 700 and 800 chill units; however, only after 800 chill units were accumulated, had more than 50% of the flower buds reached the B stage of Baggiolini.

**Table 2.** Temperatures, rainfall and chilling calculated by three models at Jumilla and Abarán (Murcia).

Date	Temperature			Rainfall		Method	
	Mean	Max.	Min	(mm)	Hours < 7 °C	Chill Units	Portions
<i>Jumilla</i>							
Nov/2004	10.0	13.4	5.5	1.9	162	138	11
Dec/2004	8.7	14.3	4.5	20.7	199	441	20
Jan/2005	6.1	12.9	-1.9	1.4	445	386	20
Feb/2005	6.6	14.9	2.6	13.6	370	223	26
March/2005	11.0	17.0	1.9	7.3	188	0	14
Total					1364	1188	91
Nov/2005	10.0	15.8	5.2	15.9	186	152	14
Dec/2005	7.7	13.0	4.1	5.5	319	448	26
Jan/2006	6.6	10.6	-2.3	46.7	367	525	21
Feb/2006	8.2	12.6	4.8	12.6	251	226	12
March/2006	13.5	19.3	7.6	0.3	74	0	19
Total					1197	1351	92
<i>Abarán</i>							
Nov/2004	12.4	15.6	8.2	7.0	74	79	14
Dec/2004	10.5	15.8	5.8	41.8	104	373	21
Jan/2005	8.3	15.1	0.3	1.6	303	396	21
Feb/2005	8.6	18.2	3.8	20.9	262	206	19
March/2005	12.3	19.1	3.6	12.6	140	0	13
Total					883	1054	88
Nov/2005	12.0	18.8	7.9	26.6	79	138	14
Dec/2005	9.8	14.4	5.4	9.7	176	394	22
Jan/2006	8.3	11.8	0.7	46.0	225	496	18
Feb/2006	10.1	15.1	7.2	19.8	126	190	19
March/2006	15.3	20.5	8.8	0.8	26	0	11
Total					632	1218	84

Source: S.I.A.M. (<http://siam.imida.es/>)

Considering the increase in bud fresh weight and phenological observations after 10 days in the laboratory, under controlled conditions, differences in chilling requirements were not found between years, but there were large differences among cultivars ($P < 0.001$). The model and the interaction cultivar-model were also significant ($P < 0.001$). In the climatic conditions of Murcia, the chilling requirements ranged widely (Table 3). 'Cristobalina' was the first cultivar to break dormancy followed by 'Brooks', Burlat', 'Ruby' and 'Somerset' (with similar,

medium chilling requirements) whereas the highest chilling requirements were observed for 'New Star' and 'Marvin'.

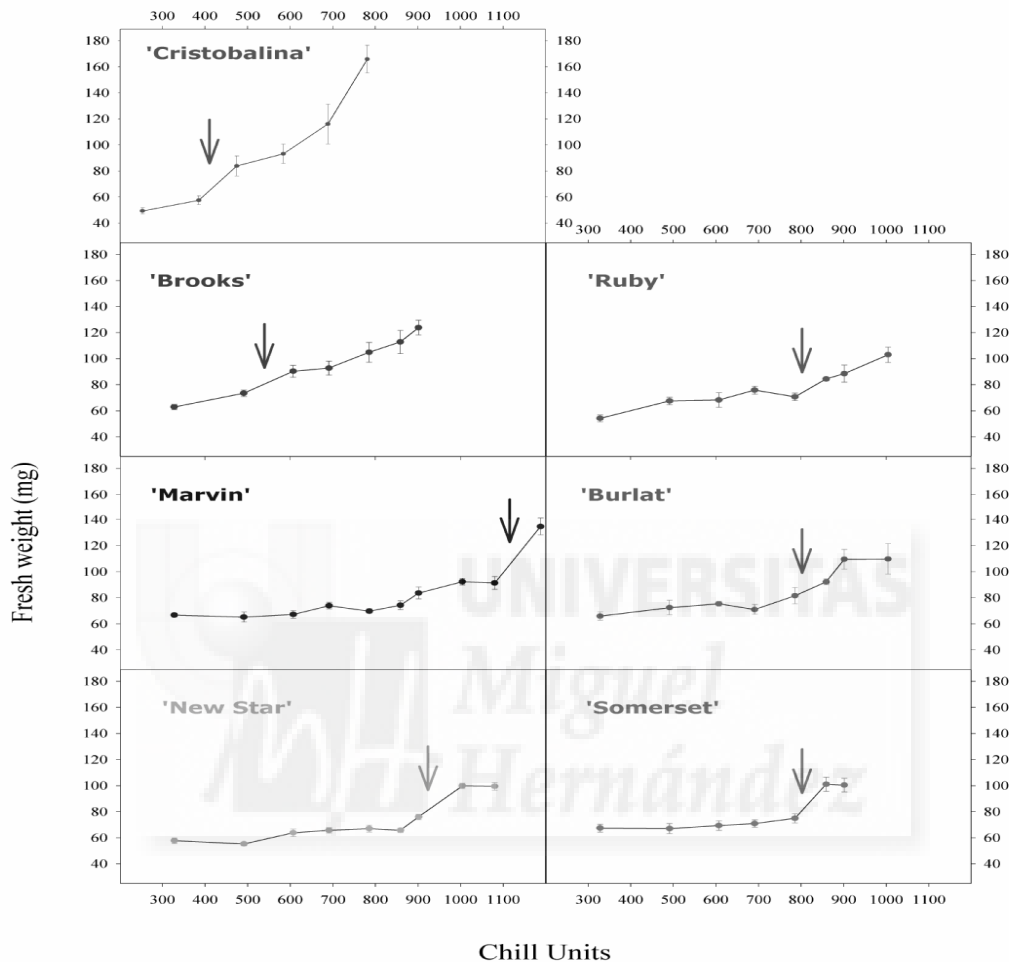


Figure 3. Fresh weight evolution of flower buds of the sweet cherry cultivars 'Cristobalina', 'Brooks', 'Ruby', 'Marvin', 'Burlat', 'New Star' and 'Somerset', as a function of chilling accumulation (Utah model). Arrows indicate the break of dormancy. Bars represent the standard error.

Correlations between different methods were calculated with the chilling requirement data. Statistical analysis indicated that the Utah and Portions models are well related (Figure 4A) and differences between years were minor. However, the relationship between chilling requirements calculated as hours below 7 °C and the Utah or Portions models depended on the year (Figure 4 B and C).



Table 3. Blooming dates, chilling and heat requirements of seven sweet cherry cultivars, calculated at Abarán (Murcia) for 'Cristobalina' and at Jumilla (Murcia) for the rest of the cultivars. Data are averages of two consecutive years.

Cultivar	H<7°C	Chill units	Portions	GDH	Blooming date
'Cristobalina'	176.0 a	397.0 a	30.4 a	9195.0 ab	March 14 th
'Brooks'	411.5 b	556.0 b	36.7 b	7863.2 ab	March 27 th
'Ruby'	618.0 c	806.0 c	48.0 c	7326.2 a	March 29 th
'Somerset'	618.0 c	806.0 c	48.0 c	8625.2 ab	April 3 rd
'Burlat'	618.0 c	806.0 c	48.0 c	8750.2 ab	April 4 th
'New Star'	709.5 cd	909.3 d	53.5 d	8257.0 ab	April 4 th
'Marvin'	788.0 d	1001.5 e	57.6 e	9449.7 b	April 9 th

Separation of cultivar means (lower-case letters) by the LSD test ($P \leq 0.05$).

Table 4. Land area as a function of altitude in Murcia.

Altitude (m)	Area (Ha)	Percentage	Accumulated percentage
0-200	169,200	15	15
201-600	485,000	43	58
601-1000	364,100	32	90
1001-2000	113,000	10	100
>2000	0	0	100
Total: 1131,300			

Source: Anuario Estadístico (<http://www.carm.es/econet/publica/anuario/>)

Heat accumulation did not differ between years and a great similarity was observed among cultivars, with values in a range between 7326 and 9450 GDH (Table 3). Only 'Ruby' and 'Marvin', with low and high heat requirements respectively, differed significantly from one another. Differences between years were observed for some cultivars, such as 'Cristobalina'.

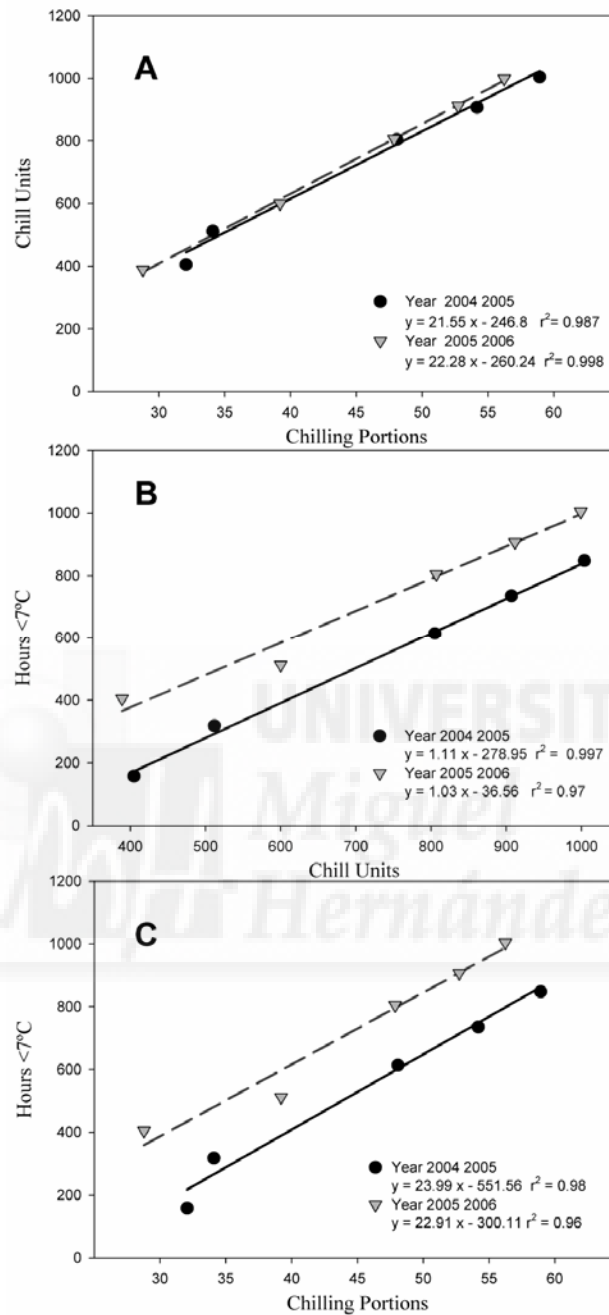


Figure 4. Correlation between the chilling requirements of seven sweet cherry cultivars, calculated as chill units (Utah model), chilling portions and hours below 7 °C.

There was a good correlation ($R^2 = 0.629$, linear regression function: $y = 700.29 + 0.71x$) between chill units, accumulated at the 42 stations within the region of Murcia, during several years, and altitude for each station (Table 1).

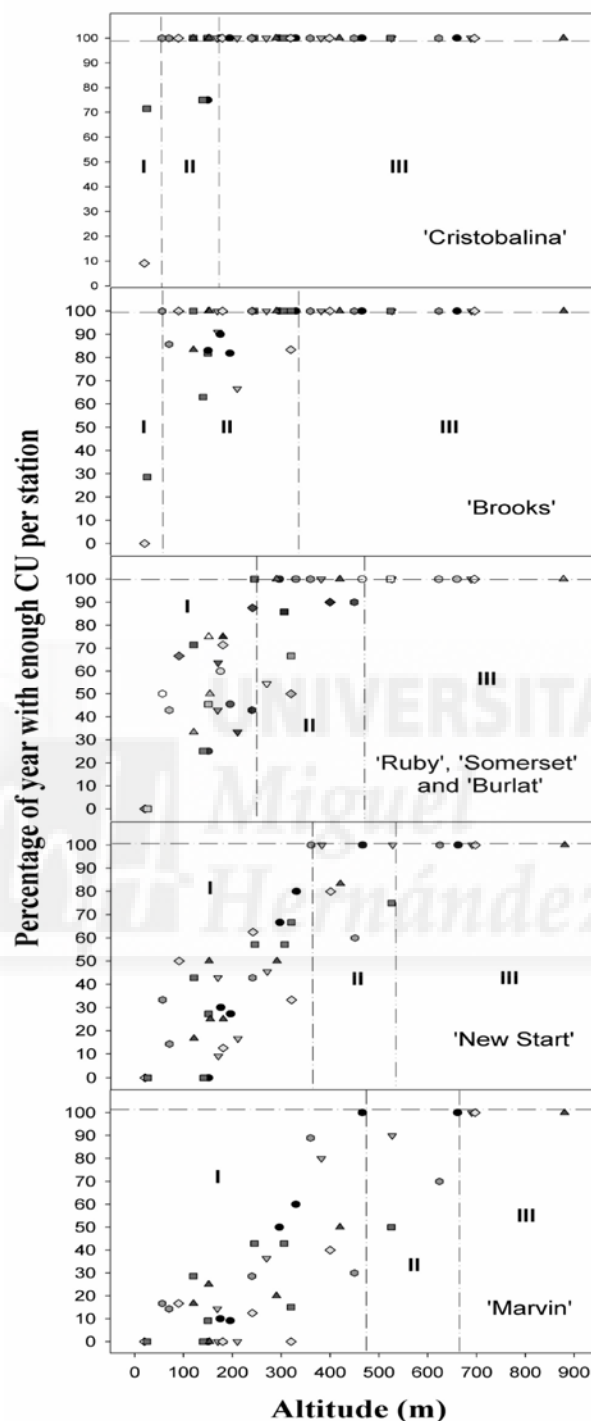


Figure 5. Percentage of years that chilling requirement for sweet cherry cultivars were satisfied in relation to the altitude where each meteorological station is located, within the region of Murcia. The vertical, discontinuous lines separate three different zones, I, II and III, representing a high, medium and low variability of the probability to fulfil chilling requirements, respectively.



Using the data for each cultivar, percentage of years with enough CU to break rest was plotted against altitude of the stations (Figure 5). The graphs were then divided vertically into 3 zones, I, II and III, representing a high, medium and low variability of the probability to fulfil chilling requirements, respectively.

'Cristobalina' could be cultivated in almost every area of the region with the exception of those close to the sea, because the percentage of years in which its chilling requirements would be satisfied is 100% at more than 175 m above sea level (Figure 5). With a very high probability, 'Brooks' would not have problems regarding the satisfaction of its chilling requirements above 325 m altitude. In our region, stations located above 450 metres would be appropriate for 'Ruby', 'Somerset' and 'Burlat'. For 'New Star' and 'Marvin', the limiting altitudes are 550 and 650 m, respectively. The distribution of areas in Murcia according to altitude is recorded in Table 4. All cultivars studied here could be grown between 600 and 1000 m above sea level, where fulfilment of their chilling requirements would be guaranteed. This represents 32% of the total area of the region. Additionally, most cultivars could be grown at much lower altitudes (up to 200 m), representing 75% of the total area (Table 4).

4. Discussion

The Utah model has been used successfully in cool climates, whereas the Dynamic model seems to better indicate the response of some fruit trees to chilling in warmer and/or subtropical areas (Dennis, 2003). In this study, differences were not found between these two models when estimating the chilling requirements for seven sweet cherry cultivars in North-western Murcia. They were used to calculate approximate flowering dates, taking into account the cultivars' heat requirements. Mean temperatures during winter are moderate and negative chilling values, generated with the Utah model, are not important, which would explain the similarity to the results obtained with the Dynamic model. However, the results obtained with the hours-below-7 °C model were not correlated with either the Dynamic or the Utah model, suggesting that this model is not appropriate for calculation of sweet cherry chilling requirements in our Mediterranean climatic conditions.

Most work on the determination of chilling requirements in sweet cherry has used the number of hours below 7 °C. It is difficult to compare results obtained by



different authors since many factors need to be considered, such as the choice of plant material, the criteria used to determine when rest is completed or the environmental conditions during the previous growing season (Dennis, 2003).

Tabuenca (1983) determined that the chilling requirements of the early-flowering cultivar 'Cristobalina' were 500-550 hours below 7 °C, whereas in this study a value of only 176 hours was found for the same cultivar. Some authors have indicated that the Californian cultivars 'Brooks', 'Marvin' and 'Ruby' have low chilling requirements: 200-250 hours below 7 °C (Marsall, 1990; Herraiz, 1992; Ballester, 1992). Accordingly, we have found that 'Brooks' had a low chilling requirement, estimated as CH, CU or CP. However, we found different results for 'Ruby' and 'Marvin', which required medium and high chilling accumulation, respectively, to break dormancy. Also, the requirements of the cultivars 'Ruby' and 'Marvin', among others, were estimated by the Utah method (Tersoglio *et al.*, 2006) and the results are in agreement with our findings for these two cultivars. 'Ruby', with less than 950 CU, reached a normal budbreak and 'Marvin' needed more than 1000 CU. Erez (2000) reported that 'Burlat' had chilling portions similar to those that we have estimated in our climatic conditions.

In general, the heat requirements for flowering of the cherry studied cultivars here were high (Table 3) compared with those calculated in other *Prunus* species such as almond (Egea *et al.*, 2003; Alonso *et al.*, 2005). In these studies, some almond cultivars had less than 6000 GDHs ('Desmayo Langueta', 'Constantini' or 'Pou de Felanitx'). A recent work estimated that heat requirements for ten apricot cultivars were under 5900 GDHs (Ruiz *et al.*, 2007). Our data show a narrow range of heat requirements, with a slight increase in the case of the late-flowering cultivar 'Marvin'. Spiegel-Roy and Alston (1979) suggested that the chilling and heat requirements of pear (*Pyrus communis* L.) are closely related to the time of bloom. Chill and heat requirements were found to be interdependent processes (Couvillon and Erez, 1985) and an inverse relationship between the effects of chilling and heat accumulation on the blooming time of peach cultivars was found (Citadin *et al.*, 2001). Greater chilling exposures lead to a reduction of heat requirements. In almond, heat requirements were found to be more important for regulation of blooming time than were chilling requirements in the cold climatic conditions of Zaragoza (North-East Spain), due to the early completion of chilling (Alonso *et al.*, 2005). However, in South-East Spain, the flowering time of some



this, our results suggest that differences in chilling requirements have a stronger influence on the blooming date than do heat requirements of sweet cherry cultivars, in our climatic conditions, and that the average blooming date of both years was earlier for cultivars with lower chilling requirements but not for those with lower heat requirements, whereas the latest-blooming cultivar needed the highest chill and heat accumulations to flower.

The results show a wide range of chilling requirements for breakage of rest for the cultivars studied, which could be grown successfully in specific areas of the region. This is supported by the fact that yields per hectare of sweet cherry in the region of Murcia are well above average yields in other regions of Spain (M.A.P.A., 2003, <http://www.mapa.es/es/estadistica/infoestad.html>). Of great interest in Murcia are those cultivars with low or medium chilling requirements, which produce early harvests and fruits of high quality without the cracking problems, that are frequent in areas with abundant rains (Caprio and Quamme, 2006).

Accumulated chilling is affected by the local geography, especially the altitude in tropical and subtropical regions (Ou and Chen, 2000). Accordingly, we have found a positive relationship between chilling accumulation and altitude of different areas in our region. The probability of satisfying the chilling requirements at different altitudes has been determined using climatic information from several years. 'Cristobalina', 'Brooks', 'Ruby', 'Burlat' and 'Somerset' can be grown with a high probability of chilling requirement satisfaction in wide areas of our region. 'New Star' and, particularly, 'Marvin' should be grown only in the highest areas of our region, to avoid problems related to lack of chilling. This is confirmed by the fact that all cultivars growing in the experimental station, at 360 m above sea level, flower without problems, with the exception of 'Marvin' which frequently shows irregular blooming and yield. Knowledge of the relationship between altitude and chill accumulation in different areas of our region, or at other locations, is of great interest when deciding which sweet cherry cultivars to plant. Further work could involve estimation of the chill and heat requirements of more sweet cherry cultivars, to complete our knowledge of the adaptability of this species to areas where its culture has not been traditional.



Acknowledgements

Authors wish to thank dr. Jose Egea and Dr. David Walker for critical review of this manuscript. N. Alburquerque was supported by a postdoctoral contract "Juan de la Cierva" from the Spanish Ministry of Education.

References

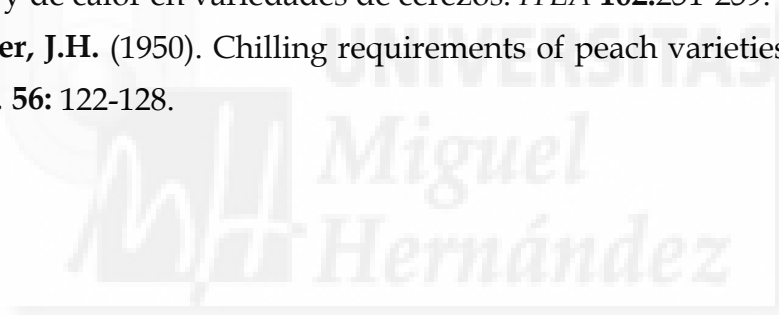
- Alonso, J.M., Ansón, J.M., Espiau, M.T., Socias i Company, R.** (2005). Determination of endodormancy break in almond flower buds by a correlation model using the average temperature of different day intervals and its application to the estimation of chill and heat requirements and blooming date. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **130**: 308-318.
- Aron, R.** (1983). Availability of chilling temperatures in California. *Agric. Meteor.* **28**: 351-363.
- Baggiolini, M.** (1952). Stade repères du pecher. *Revue Romande d'Agriculture, Viticulture et Arboriculture* **4**: 29.
- Ballester, A.** (1992). El cultivo del cerezo en la Comunidad Valenciana. *Fruticultura Profesional* **49**: 31-42.
- Caprio, J. M., Quamme, H. A.** (2006). Influence of weather on apricot, peach and sweet cherry production in the Okanagan Valley of British Columbia. *Can. J. Plant Sci.* **86**: 259-267.
- Citadin, I., Raseira, M.C.B., Herter, F.G., Baptista da Silva, J.** (2001). Heat requirement for blooming and leafing in peach. *HortScience.* **36**: 305-307.
- Couvillon, G.A., Erez, A.** (1985). Influence of prolonged exposure to chilling temperatures on bud break and heat requirement for bloom of several fruit species. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **110**: 47-50.
- Dennis, Jr. F.G.** (2003). Problems in standardizing methods for evaluating the chilling requirements for the breaking of dormancy in buds of woody plants. *HortScience* **38**: 347-350.
- Egea, J., Ortega, E., Martinez-Gomez, P., Dicenta, F.** (2003). Chilling and heat requirements of almond cultivars for flowering. *Environ. Exp. Bot.* **50**: 79-85.
- Erez, A.** (2000). Bud dormancy; phenomenon, problems and solutions in the tropics and subtropics. In: Erez, A. (Ed.), *Temperate Fruit Crops in Warm Climates*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 28-29



- Erez, A., Couvillon, G. A.** (1987). Characterization of the influence of moderate temperatures on rest completion in peach. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **112**: 677-680.
- Erez, A., Couvillon, G. A., Hendershott, C. H.** (1979a). The effect of cycle length on chilling negation by high temperatures in dormant peach leaf buds. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **104**: 573-576.
- Erez, A., Couvillon, G. A., Hendershott, C. H.** (1979b). Quantitative chilling enhancement and negation in peach buds by high temperatures in a daily cycle. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **104**: 536-540.
- Gariglio, N., Rossia, D.E.G., Mendow, M., Reig, C., Agusti M.** (2006). Effect of artificial chilling on the depth of endodormancy and vegetative and flower budbreak of peach and nectarine cultivars using excised shoots. *Scientia Hort.* **108**: 371-377.
- Gilreath, P. R., Buchanan, D. W.** (1981). Rest prediction model for low chilling "Songolds" nectarine. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **106**: 426-429.
- Guerriero, R., Viti, R., Monteleone, P., Gentili, M.** (2002). la valutazione della dormienza nell'albicocco: tre metodi a confronto. *Frutticoltura* **3**: 73-77.
- Herraiz, V.** (1992). El cultivo del cerezo en la Comarca de la Almunia. *Fruticultura Profesional* **49**: 31-42.
- Lichou, J., Edin, M., Tronel, C., Sounier, R.** (1990). Le Cerisier. Ctifl, Paris.
- Mahmood, K., Karew, J.G., Hadley, P., Battey, N.H.** (2000). Chill unit models for the sweet cherry cvs Stella, Sunburst and Summit. *J. Hort. Sci. Biotech.* **75**: 602-606.
- Marsall, J.** (1990). Plantaciones intensivas o semi-intensivas de cerezo. *Fruticultura Profesional* **30**: 55-60.
- Meier, U., Graf H., Hack H., Hess M., Kennel W., Klose R., Mappes D., Seipp D., Stauss R., Streif J., Van den Boom T.** (1994). Phänologische Entwicklungsstadien des Kernobstes (*Malus domestica* Borkh. und *Pyrus communis* L.), des Steinobstes (*Prunus*-Arten), der Johannisbeere (*Ribes*-Arten) und der Erdbeere (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd* **46**: 141-153.



- Ou, S.K., Chen C.L.** (2000). Estimation of the chilling requirement and development of a low-chill model for local peach trees in Taiwan. *J. Chin. Soc. Hort. Sci.* **46**: 337-350.
- Richardson, E.A., Seeley S.D., Walker, D.R.** (1974). A model for estimating the completion of rest for 'Redhaven' and 'Elberta' peach trees. *Hort.Sci.* **1**: 331-332.
- Ruiz, D., Campoy, J.A., Egea, J.** (2007). Chilling and heat requirements of apricot cultivars for flowering. *Environ. Exp. Bot.* **61**: 254-263.
- Spiegel-Roy, P., Alston, F.H.** (1979). Chilling and post-dormant heat requirement as selection criteria for late-flowering pears. *J. Hort. Sci.* **54**: 115-120.
- Tabuenca, M.C.** (1983). Necesidades de frío invernal de variedades de cerezo. *Anales Aula Dei* **16**: 661-667.
- Tersoglio, E., Naranjo, G., Rivero, L., Quiroga, M.** (2006). Requerimiento de frío invernal y de calor en variedades de cerezos. *ITEA* **102**:251-259.
- Weinberger, J.H.** (1950). Chilling requirements of peach varieties. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* **56**: 122-128.





CAPITULO II

Short communication. Influence of storage temperature on the viability of sweet cherry pollen.

Alburquerque, N., García-Montiel, F., Burgos, L. (2007).

Spanish Journal of Agricultural Research **5(1):** 86-90.



Abstract

The conditions to store sweet cherry pollen of six cultivars ('Cristobalina', 'Brooks', 'Ruby', 'Somerset', 'New Star' and 'Marvin') for a long period of time were studied. Pollen samples were stored at 4 °C or -20 °C and were taken at 7, 15, 30, 60, 90, 180, 270, 365 or 540 days of storage for all cultivars (with the exception of 'Somerset' at 30 days). 'Cristobalina' showed the highest pollen germination (over 60%). For the rest of cultivars, maximum pollen germination ranged from 36% to 44%. Pollen viability was completely lost for most cultivars after only 60 days of storage at 4 °C. However, percentages of germinated pollen in all cultivars were not different from the control after one year of storage at -20 °C, with the exception of 'New Star' and 'Marvin' that showed a reduction in pollen germination. Storage for periods longer than one year at -20 °C produced a decrease in pollen viability with the exception of 'Cristobalina' and 'Somerset' pollen that maintained similar viability at all times. Results indicate that pollen viability could be maintained at reasonably high percentages after storage at -20 °C during one year for all cultivars studied.

Additional key words: *in vitro* pollen germination, low temperature storage, *Prunus avium* L.

Resumen

Nota corta. Influencia de la temperatura de conservación sobre la viabilidad del polen de cerezo.

Se han estudiado las condiciones de conservación del polen de seis variedades de cerezo ('Cristobalina', 'Brooks', 'Ruby', 'Somerset', 'New Star' y 'Marvin') durante un largo período de almacenamiento. El polen se conservó a 4 °C y -20 °C y se tomaron muestras a los 7, 15, 30, 60, 90, 180, 270, 365 y 540 días de almacenamiento de todas las variedades, con la excepción de 'Somerset' a los 30 días. 'Cristobalina' mostró los porcentajes de germinación mayores (por encima de 60%). Los valores alcanzados por el resto de las variedades oscilaron entre el 36% y el 44%. La mayoría de las variedades perdieron completamente la viabilidad del polen tan solo a los 60 días de conservación a 4 °C. Sin embargo, los porcentajes de germinación del polen conservado a -20 °C no variaron después de un año,



excepto en las variedades 'New Star' y 'Marvin', que mostraron una reducción en su germinación. La conservación del polen a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un periodo superior al año disminuyó la viabilidad del polen, excepto en el caso de 'Cristobalina' y 'Somerset' donde la viabilidad fue similar durante todo el tiempo. De los resultados de este trabajo se puede concluir que la viabilidad del polen de cerezo se puede mantener en porcentajes razonablemente elevados durante un año a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en todas las variedades estudiadas.

Palabras clave adicionales: conservación a bajas temperaturas, germinación del polen *in vitro*, *Prunus avium* L.

1.- Introduction

Sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit tree can be found in many different countries with a temperate climate, between 35° latitude North and 55° latitude South (Lichou *et al.*, 1990). Fruits are very appreciated for their flavour and beneficial characteristics for health (Serrano *et al.*, 2005).

Pollen viability may decrease quickly depending upon the storage conditions. Mayer *et al.* (1988) found that pollen viability decreased to half after 4 hours at $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ or 1 hour at $27,7\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Controlled cross-pollinations require using selected pollen from elite cherry cultivars, since most of them are self-incompatible and bloom times often do not overlap between cultivars (from 3 to 4 weeks differences between late and early flowering). Due to these differences usually pollen is collected and dried before hand pollination. Also, exchange of pollen between breeders is a common practice that simplifies most quarantine requirements. Pollen needs adequate storage conditions to avoid losing viability. Viability of *Prunus* pollen, including old sweet cherry cultivars, after storage for long periods of time were carried out and published many years ago (Griggs *et al.*, 1953). However, cultivars studied here are relatively new selections of great interest obtained from different breeding programmes or local Spanish cultivars and, as far as we know, their pollen viability has not been tested before.

In the last years, many new cultivars have been released from different breeding programmes all over the world. Some of them are of low-chilling requirements which would be imperative in most Mediterranean areas. Many of them are being introduced and tested in our conditions. Here we are studying the



conditions to store sweet cherry pollen for a long period of time. Such methodology is useful to efficiently plant hybridizations between cultivars flowering very separately in time.

2.- Materials and methods

2.1.- Plant material

Pollen of six sweet cherry cultivars, 'Cristobalina', 'Brooks', 'Ruby', 'Somerset', 'New Star' and 'Marvin' were used in this study. Flowers at E stage of Baggiolini (1952) (showing the stamens) were collected from the field and carried to the laboratory. Anthers were removed from flowers and immediately dehydrated in a chamber under controlled conditions (22 °C and 20% RH) during 24-28 hours. After desiccation, 15 mg pollen samples were placed in 1.5 mL eppendorf tubes and stored at 4 °C or -20 °C.

2.2.- Experimental design

Pollen samples were taken at 7, 15, 30, 60, 90, 180, 270, 365 or 540 days of storage for all cultivars (with the exception of 'Somerset' at 30 days). Pollen was dusted onto Petri dishes with 25 mL of a medium containing 15% sucrose and 1.2% bactoagar (Parfitt and Almehdi, 1984; Remy, 1953). Since the appropriate temperature for sweet cherry pollen germination was found between 22 °C and 25 °C (Bargioni, 1980), dishes were incubated for 20 hours at 23 °C.

To evaluate pollen germination, an optical microscope with a 40x ocular was used and pollen grains were considered as germinated when the length of the pollen tube exceeded its diameter (Figure 1).

2.3.- Statistical analysis

For each treatment combination (pollen genotype, temperature and storage time), germination was recorded by counting ten different ocular fields with a similar number of pollen grains (35-50 each one), to avoid a possible effect of high pollen density on germination (Giulivo and Ramina, 1974; Kwack, 1965). Each count was considered as a replicate. Germination percentages were transformed by arcsine root square and ANOVA analysis was carried out. Means were compared with the first record after 7 days storage, as the control, using a Dunnett test. Statistical analyses were performed with SAS.

There were significant differences among pollen genotypes, temperatures, time of storage ($P < 0.001$) and all possible interactions were also significant (Table 1). Therefore, the effect of storage time on pollen viability was analysed separately for each cultivar and storage temperature.



Figure 1. Sweet cherry pollen grains germinated (G) showing the pollen tube and non germinated, without pollen tube (NG).

3.- Results and discussion

Pollen viability decreased after 15 or 30 days of storage at 4 °C (Figure 2). However, pollen remained viable in most cultivars up to one year of storage at -20 °C.

When cultivars were studied separately, 'Cristobalina' showed the highest pollen germination (over 60%). For the rest of cultivars, maximum pollen germination ranged from 35.98% to 43.76%. The relatively low germination percentages found with these cultivars contrast with those reported by Bargioni and Cossio (1980) who found germination values between 70% and 80% for the cherry cultivars. However, our results are in agreement with those found by Hedhly *et al.* (2005), who studied pollen germination of nine sweet cherry cultivars



testing *in vitro* pollen performance under two temperatures regimes (15 °C and 30 °C).

Table 1. Analysis of variance using GLM procedure for pollen germination *in vitro* of six cherry genotypes

Source	d.f.	F value	Pr>F
Pollen genotype	5	310.63	<0.0001
Temperature	1	1212.95	<0.0001
Storage time	8	215.51	<0.0001
Pollen genotype x Temperature	5	23.24	<0.0001
Pollen genotype x Storage time	39	10.72	<0.0001
Temperature x Storage time	8	152.98	<0.0001
Pollen genotype x Temperature x Storage time	36	9.22	<0.0001
Error	927		

They found a highly significant effect of pollen genotype and temperature. Higher temperature reduced pollen germination, which maximum values were between approximately 40% in 'Talaguera Brillante' and 'Ambrunés' cultivars and 70% in 'Van' or 'Bing' cultivars. Also differences in pollen performance have been found in different genotypes of sweet cherry by Hormaza and Herrero (1999) or in other *Prunus* species such as apricot (Egea *et al.*, 1992) and almond (Martínez-Gómez *et al.*, 2002).

In this study, for most cultivars pollen completely lost viability after only 60 days of storage at 4 °C. Remarkably, 'Cristobalina' and 'New Star' maintained viable pollen in relatively high percentages up to one more month at this temperature.

Pollen viability in all cultivars was not different from the control after one year of storage at -20 °C, with the exception of 'New Star' and 'Marvin' pollen which viability was significantly lower after 365 days from the first recorded germination percentage measured after 7 days.

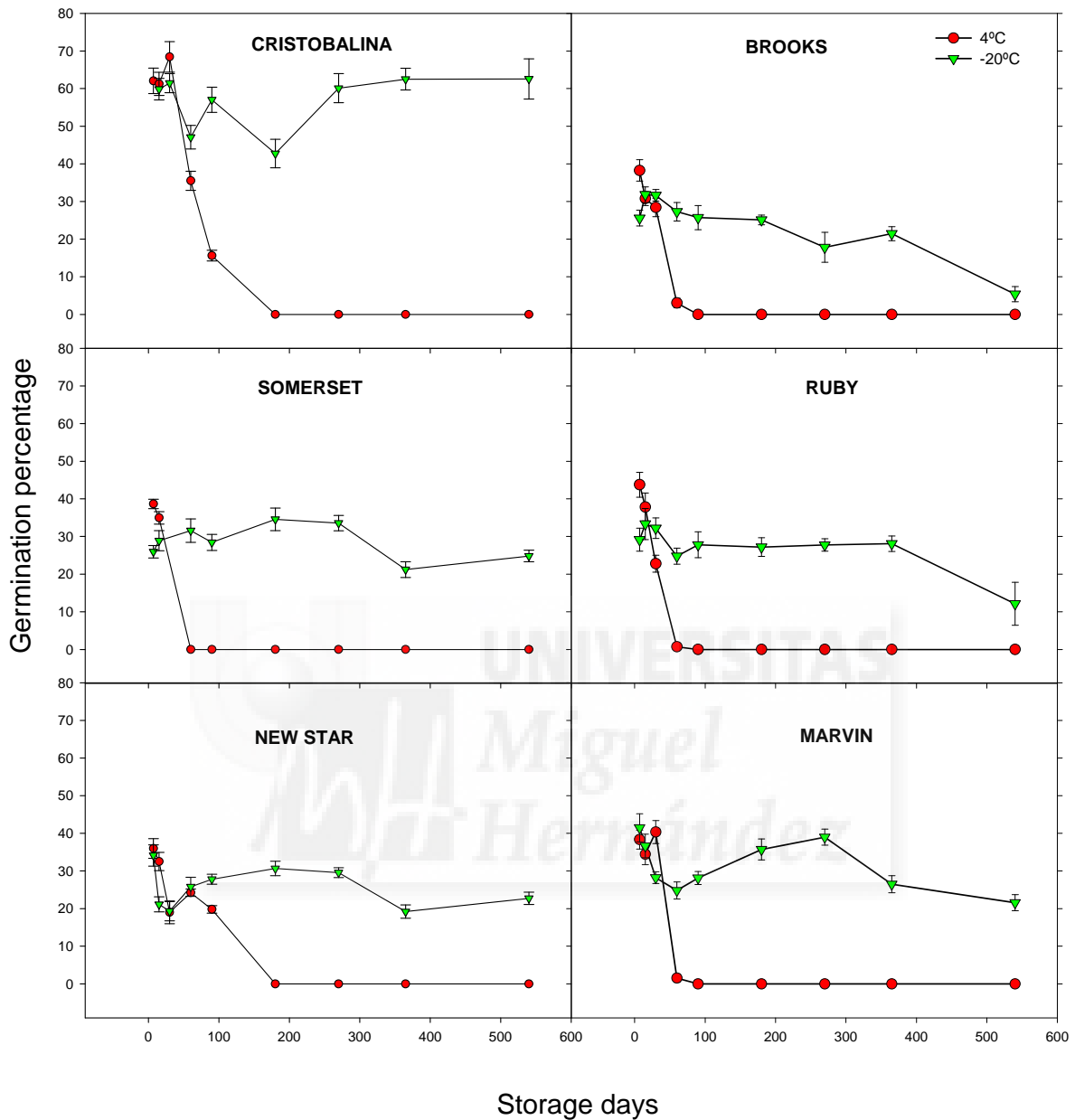


Figure 2. *In vitro* germination of pollen grains of six sweet cherry genotypes after storage at 4 °C (circles) or -20 °C (triangles) during different periods of time. Verticals bars represent the standard error.

However, results at 365 days were not significantly different from those obtained from some of the previous sampling days (i.e. 30, 60 or 90 days). Pollen from ‘Marvin’ and ‘New Star’ stored at -20 °C showed a lower viability after 30 days than after 180 and 270 days. A high density of pollen grains in the culture medium has been described to have a positive influence on pollen germination



(Giulivo and Ramina, 1974; Kwack, 1965). Although care was taken to uniformly distribute pollen grains and to choose ocular field where a similar number of pollen grains was present, small differences could explain the unexpected results observed.

Fogle (1975) and Brown *et al.* (1996) indicated that freezing or freeze-drying of cherry pollen, in general, delays loss of viability when the pollen is stored for many years. We have found that pollen germination remained similar in the case of 'Cristobalina' and 'Somerset' after storage for periods longer than one year at -20 °C. However, pollen germination was reduced in 'New Star', 'Marvin', 'Brooks' and 'Ruby' after 540 days of storage at -20 °C, which was approximately half of that recorded in the control. Griggs *et al.* (1953) found a slight decrease of germination percentages in pollen of 'Black Tartarian' and 'Napoleon' cultivars stored more than 400 days at -18 °C. All these results seem to indicate that pollen viability can be affected by long periods of storage at approximately -20 °C, being this effect genotype dependent.

Low temperature storage of pollen has been studied in some species. Martínez-Gómez *et al.* (2000) indicated that pollen of two almond cultivars was viable during 8 weeks when was stored at 4 °C. This results were confirmed later with four different almond cultivars (Martínez-Gómez *et al.*, 2002) and also the authors found that storage conditions below 0 °C (-20 °C and -80 °C) did not affect pollen germination after one year. In a recent work Lora *et al.* (2006) observed that germination of cherimoya pollen stored at sub-zero temperatures (-20, -80 and -196 °C) was progressively reduced with conservation time at three temperatures studied, reaching a minimum after 90 days of storage. No differences in pollen germination among temperatures were observed for up to 30 days.

4.- Conclusions

From results in this work it can be concluded that storage at -20 °C during one year does not affect pollen viability of the cultivars 'Cristobalina', 'Brooks', 'Somerset' and 'Ruby', whereas viability was still relatively high for the rest of cultivars.

Although there are some previous studies on the storage of pollen from cherry cultivars for short or long periods of time at different temperatures, to our knowledge, cultivars studied here have been tested for the first time since they are



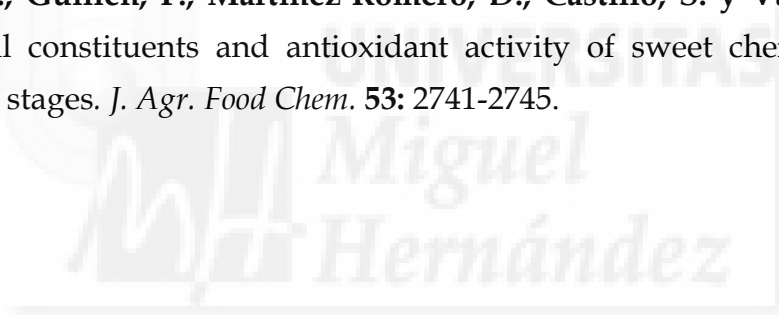
relatively new selections from breeding programmes or self-compatible and early-ripening local Spanish cultivars. A procedure to appropriately conserve pollen, maintaining a good viability, may allow a better planning of controlled crosses and also provide a way of exchanging pollen between breeding programmes.

References

- Baggiolini, M.** (1952). Stade repères du pecher. *Rev. Romande Agri. Vitic. Arboriculture* **4**: 29.
- Bargioni, G.** (1980). La pollinisation du cerisier. *Proc. Intl. Symp. "La cultura du cerisier"*. Gembloux., pp 178-190.
- Bargioni, G. y Cossio, F.** (1980). Cited by Lichou *et al.*, in *Le cerisier, 1990*, Ed. Ctifl, Paris, France. pp 56-58.
- Brown, S.K., Iezzoni, A.F. y Fogle, H.W.** (1996). Cherries. In: Fruit breeding I: tree and tropical fruits. (Janick J. and Moore J.N., eds.). Ed. Purdue Univ. Press. W. Lafayette, IN., pp 213-255.
- Egea, J., Burgos, L., Zoroa, N. y Egea L.** (1992). Influence of temperature on the *in vitro* germination of pollen of apricot (*Prunus armeniaca* L.). *J. Hort. Sci.* **67**: 247-250.
- Fogle, H.W.** (1975). Cherries. In: Advances in fruit breeding. (Janick J. and Moore J.N., eds.). Ed. Purdue Univ. Press. W. Lafayette, IN., pp 348-366.
- Giulivo, C. y Ramina A.** (1974). Effeto di massa ed azione del calcio sulla germinazione del polline di alcune specie arboree da frutto. *Riv. Ortoflorofruitt. It.* **58**: 3-13.
- Griggs, W.H., Vansell, H. y Iwakiri B.T.** (1953). The storage of hand-collected and bee-collected pollen in a home freezer. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **62**: 304-305.
- Hedhly, A., Hormaza, J.I. y Herrero M.** (2005). Influence of genotype-temperature interaction on pollen performance. *J. Evol. Biol.* **18**: 1494-1502.
- Hormaza, J.I. y Herrero M.** (1999). Pollen performance as affected by the pistilar genotype in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Protoplasma* **208**: 129-135.
- Kwack, B.H.** (1965). The effect of calcium on pollen germination. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **86**: 818-823.
- Lichou, J., Edin, M., Tronel C. y Saunier, R.** (1990). L'espèce. In: *Le cerisier. Ed. Ctifl*, Paris, pp 39.



- Lora, J., Pérez de Oteyza, M.A., Fuentetaja, P. y Hormaza J.I. (2006). Low temperature storage and *in vitro* germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) pollen. *Sci. Hort.* **108**: 91-94.
- Mayer, D., Rathbone, L. y Miliczky, E. M. (1988). New ideas in cherry pollination. *Proc. Ann. Mtg. Wash. St. Hort. Ass.*, 228-229.
- Martínez-Gómez, P., Gradziel, T.M., Ortega, E. y Dicenta F. (2000). Short-term storage of almond pollen. *HortScience* **35**: 1151-1152.
- Martínez-Gómez, P., Gradziel, T.M., Ortega, E. y Dicenta, F. (2002). Low temperature storage of almond pollen. *HortScience* **37**: 691-692.
- Parfitt, D.E. y Almehdi, A. (1984). Liquid nitrogen storage of pollen from five cultivated *Prunus* species. *HortScience* **19**: 69-70.
- Remy, P. (1953). Contribution a l'etude du pollen der arbres fruitiers a noyau, genre *Prunus*. *Ann. Amelior. Plantes* **3**: 351-388.
- Serrano, M., Guillén, F., Martinez-Romero, D., Castillo, S. y Valero D. (2005). Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *J. Agr. Food Chem.* **53**: 2741-2745.





CAPITULO III

*Factors influencing fruit set and quality in different
sweet cherry cultivars*

García-Montiel, F., Serrano, M., Martínez-Romero, D.,
Alburquerque, N. (2009). *Spanish Journal of Agricultural Research*
(in press).



Abstract

The aim of this work is the characterisation of seven cultivars of sweet cherry grown at Murcia (Spain). The cultivars 'Brooks', 'Marvin', 'Ruby', 'Burlat', 'New Star' and 'Somerset' were grown in an experimental field located at Jumilla, whereas 'Cristobalina' was grown in a private orchard located at Abarán. Flower density, flower buds drop, number of developing flower buds and total number of flowers per node, fruit set and percentage of double fruits have been determined from 2004 to 2007. Also some parameters related to fruit quality, such as fruit weight, colour, soluble solids, total acidity and firmness were evaluated at different ripening stages. The number of flower buds per node, total number of flowers per node, fruit set and percentage of double fruits had a great variability between cultivars and the year also had a strong influence in these parameters, with the exception of double fruit production. Likewise, all fruit quality parameters were very different between cultivars and ripening stages. The cultivar 'Brooks' shows high production of flower buds and an appropriate total number of flowers per node in different years, besides high levels of total soluble solids (TSS), ripening index and fruit firmness. 'Burlat' and 'Somerset' ranged medium values of most of the analyzed floral biology and fruit quality parameters. In 'Cristobalina' and 'Marvin' the production of flower buds and total number of flowers per node in different years was acceptable. In addition, the self-compatible cultivar 'Cristobalina' had high fruit set percentages in all years of study, but the fruit size and the fruit firmness values were low. In 'Marvin' the percentage of double fruits was low. The maturation period of 'Marvin' fruits was very short and at the commercial ripening stage these fruits showed the darkest red colour. Although 'Ruby' recorded high production of flower buds and total number of flower per node in different years, the fruit set was very erratic and the percentage of double fruits was high. This cultivar presented a good ripening index and fruit firmness levels. The self-compatible cultivar 'New Star' is characterized by the consistent high fruit set percentages and low percentage of double fruits as well as the good fruit size and firmness levels.

Since the interest of breeders is diverse, the knowledge of floral biology, fruit set behaviour or fruit quality of the cultivars studied here could be useful to



choose the appropriate ones to be grown under Mediterranean climatic conditions or used as parentals in future breeding programs.

Keywords: flower buds, fruit set, fruit quality, breeding.

Resumen

En este trabajo se ha realizado la caracterización pomológica de siete variedades de cerezo, cultivadas en la Región de Murcia. Las variedades 'Brooks', 'Marvin', 'Ruby', 'Burlat', 'New Star' y 'Somerset' se encuentran en una finca experimental en Jumilla, mientras que 'Cristobalina' es cultivada en un huerto situado en Abarán. Se han determinado parámetros florales como densidad de yemas de flor, número de yemas de flor y número total de flores por ramillete, caída de yemas, porcentaje de cuajado de frutos y de frutos dobles desde 2004 hasta 2007. También se determinaron algunos parámetros relacionados con la calidad de las cerezas, como peso, color, sólidos solubles, acidez total y firmeza. Tanto el número de yemas de flor y número total de flores por ramillete como el cuajado y el porcentaje de frutos dobles fueron diferentes entre variedades y también entre años, excepto en el caso del porcentaje de frutos dobles. Asimismo, todos los parámetros de calidad de fruto estudiados diferían entre variedades y estados de madurez. La variedad 'Brooks' además de mostrar una elevada producción de yemas florales y un número adecuado de flores por ramillete, registró altos niveles de sólidos solubles totales, índice de madurez y firmeza. 'Burlat' y 'Somerset' alcanzaron valores medios en la mayoría de los parámetros de biología floral y calidad de fruto analizados. En 'Cristobalina' y 'Marvin', tanto la producción de yemas de flor como de flores totales por ramillete en diferentes años fue adecuada. Además, en la variedad autocompatible 'Cristobalina' el porcentaje de cuajado de frutos fue elevado en todos los años de estudio, aunque el tamaño de la cereza y sus valores de firmeza fueron muy bajos. 'Marvin' presentó un porcentaje de frutos dobles bajo, un período de maduración bastante corto y fue la variedad que presentó el color rojo más oscuro. 'Ruby' tuvo un elevado número de yemas de flor y de flores totales por ramillete, sin embargo el cuajado de frutos fue muy errático y la presencia de frutos dobles importante. Esta variedad registró un buen índice de madurez, así como buena firmeza. La variedad autocompatible 'New Star' destacó por los elevados porcentajes de



cuajado y escasez de frutos dobles, además de buen tamaño de los frutos y elevada firmeza.

Debido a que el interés de los mejoradores es diverso, el conocimiento de la biología floral, el cuajado de frutos o la calidad de los frutos de las variedades de cerezo estudiadas en este trabajo podría ser útil para elegir las variedades que se pueden adaptar bien a las condiciones de clima mediterráneo y elegir buenas candidatas como parentales en futuros programas de mejora.

Palabras clave: yemas de flor, cuajado, calidad del fruto, mejora genética.

1.- Introduction

Sweet cherry (*Prunus avium* L.) is one of the most appreciated fruit by consumer due to its excellent quality. Spain is one of the main cherry producers in Europe, with production of 75,738 t in 2007, which represents 14% of the total in the European Union (MAPYA, 2008). This is an interesting alternative crop in southeast of Spain because it is complementary to apricot, plum or early peach. This species needs less water and nitrogen supply than other tree crops and it is tolerant to *Plum Pox Virus* (Sharka), which is an important problem in apricot and plum.

In the last years, many new cultivars have been released from different breeding programmes all over the world. The interest of breeders is diverse but the knowledge of different aspects such as floral biology, fruit set behaviour or fruit quality of each cultivar could help them to choose the appropriate cultivars to be grown in a particular area with specific climatic conditions or as parentals in a breeding program. There are many factors related to floral biology of fruit trees that influence productivity, such as flower bud density, flower bud drop, flower quality or fruit set. Although problems related to poor yields are frequently found in some sweet cherry cultivars, there are few studies on floral biology that could help to better understand the cause of these problems. Thus, in different cultivars of *Prunus* species such as apricot or sour cherry, the influence of weather conditions on pollination, ovule longevity and fruit set has been studied in many fruit varieties (Burgos and Egea, 1993; Guerriero *et al.*, 1985; Furukawa and Bukovac, 1989). Also the flower bud production has been studied in several cultivars of peach and nectarine (Bellini and Gianelli, 1975; Okie and Werner, 1996) or apricot (Alburquerque *et al.*, 2004; Ruiz and Egea, 2008).



Other factor that may have a negative effect on fruit production and yield is the flower bud drop. Although the causes for high percentages of flower bud drop appear diverse (climatic conditions, chilling requirements, frost, etc.), this trait has been found as genotype-dependent in some apricot cultivars (Legave, 1975; Legave *et al.*, 1982; Albuquerque *et al.*, 2004; Ruiz and Egea, 2008).

Particularly in sour or sweet cherry there are some components that contribute to fruit set and yield, such as the number of flowers per bud and the number of flowering nodes per branch (Iezzoni and Mulinix, 1992). Early drop of flowers is a normal process in many species (Guitian, 1993), which decreases fruit set, being an important factor on determining the final yield of fruit species. The influence of different factors such as climatic conditions or genotype, on fruit set has been studied in different fruit crops including sweet cherry (Caprio and Quamme, 1998; Hedhly *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2004; Choi and Andersen, 2001).

Sweet cherry is highly appreciated by consumers due to its excellent quality. Although the concept of “fruit quality” depends on the product itself and the consumer’s preferences, it is widely accepted that the main characteristics related to sweet cherry quality are fruit weight, colour, firmness, sweetness, sourness, flavour and aroma with important differences among cultivars (Romano *et al.*, 2006; Díaz-Mula *et al.*, 2009). Thus, fruit quality parameters, together with floral biology aspects, are important factors to be taking into account to choose parentals for a breeding programme.

In this study, seven sweet cherry cultivars, including one local variety, were chosen as representative of different flowering times and productivity to analyse the influence of the cultivar on flower buds production, the number of flower buds per node, flower buds drop, the total number of flowers per node and fruit set. These parameters were studied to establish their variability and the effect on crop productivity. In addition, same parameters related to fruit quality such as colour changes, the soluble solids content, total acidity and firmness were studied at different ripening stages.



2.- Materials and methods

2.1.- Plant material

The sweet cherry cultivars assayed were 'Brooks', 'Marvin' (also called '4-70') and 'Ruby' (California-USA), 'Burlat' (France), 'New Star' (Canada), 'Somerset' (New York-USA) and 'Cristobalina' (Spain). The cultivars were chosen because they span the range of flowering time when cultivated in Murcia (South-East Spain) under the Mediterranean climate. Most of the cultivars were grown in an experimental field located at Jumilla, with the exception of 'Cristobalina', which was grown in a private orchard located at Abarán and all of them were grafted on 'SL-64' (*Prunus mahaleb* L.) rootstock. Cultivars were planted in 1999 and the planting distance was 5 m x 3 m. The averages of the annual production during the experiment were 18-20 Kg/tree for 'Marvin', 20-25 kg/tree for 'Burlat' and 'Brooks', 30-35 kg/tree for 'Somerset', 35-40 kg/tree for 'Ruby' and 'New Star' and more than 40 kg/tree for 'Cristobalina'.

'New Star' and 'Cristobalina' are self-compatible and the rest are self-incompatible, although they have overlapping blooming periods, showing compatibility with each other.

2.2.- Culture conditions

Hourly temperatures were provided by 'Servicio de Información Agraria de Murcia' (S.I.A.M.; <http://www.carm.es/cagr/cida/indexsiam.html>). The meteorological stations were located in the experimental field at Jumilla and very close to the private orchard at Abarán. Table 1 shows average maximum and minimum, rainfall and total chill units at the sampling sites from 2004 to 2007. Chilling requirements, flowering and harvest time were recorded for all cultivars in Jumilla and Abarán during two consecutive years (2004 and 2005, Table 2).

In both experimental fields the irrigation treatments were carried out using a drip irrigation system with two emitters (each delivering 4 L/h) per tree. Total water amounts applied were 3675 m³/ha and the fertilization doses were 50 Kg/ha of nitrogen, 80 Kg/ha of phosphorus and 120 Kg/ha of potassium (33.5% N, 18% P₂O₅ and 46% K₂O).

2.3.- Experimental design

The experimental orchards contained six trees of each cultivar in a completely randomised design. Three trees per cultivar were randomly chosen. Two branches



with 'bouquets of May' inserted on two years old wood of similar size per tree were selected and marked after fall defoliation. At the stage B (Baggiolini, 1952, modified by Lichou *et al.*, 1990) when the flower buds were easily identified, "flower bud density" was recorded in the six chosen branches and expressed as number of flower buds per cm of branch, in order to measure flower bud production. Total number of flower buds at stage D (Lichou *et al.*, 1990) was also recorded, as well as the percentage of dropped flower buds in those branches (flower buds drop). The number of flower bud per node or per 'bouquet of May' was determined and, due to the different number of flowers that have cherry flower buds, total number of flowers per node or per 'bouquet of May' was determined at bloom (when flowers were opened). Fruit set percentage was calculated as the number of fruits at harvest date per total remaining flowers at bloom (Alburquerque *et al.*, 2004). Also the percentage of double fruits was determined in 'Brooks', 'Burlat', 'Marvin', 'New Star', 'Ruby' and 'Somerset' as the number of double fruits per total number of fruits in six different branches of each cultivar, which had at least 50 fruits.

Table 1. Average maximum and minimum temperatures (°C), rainfall and chill units calculated with Utha method (Richardson *et al.*, 1974) in Jumilla and Abarán (Murcia) during four consecutive years.

	Maximum temperature (°C)	Minimum temperature (°C)	Rainfall (mm)	Chill Units
Jumilla				
2004	25.7	8.4	286.0	1025.0
2005	26.2	5.9	88.4	1208.0
2006	26.7	6.3	207.3	1247.5
2007	25.5	7.5	292.8	1107.5
Abarán				
2004	27.9	10.5	256.9	678.0
2005	26.7	8.3	186.2	1132.5
2006	27.2	8.3	245.0	1004.5
2007	26.1	10.5	288.7	779.0

Flower bud density, flower buds drop, number of flower buds per node, total number of flowers per node and fruit set were observed during three consecutive years (2005, 2006 and 2007) for all cultivars. 'Brooks', 'Marvin' and 'Ruby' were also sampled in 2004. The percentage of double fruits was recorded in 2005, 2006



and 2007 for all cultivars with the exception of 'Cristobalina' which was sampled only in 2005.

Table 2. Full blooming dates (50% of flowers completely open) and harvest dates (commercial ripening stage, S4). Data are average from two consecutive years (2004-2005) for blooming and harvest days.

Cultivar	Blooming date	Harvest date
'Cristobalina'	March 14 th	April 18 th
'Brooks'	March 27 th	May 12 th
'Ruby'	March 29 th	May 10 th
'Somerset'	April 3 rd	May 20 th
'Burlat'	April 4 th	May 3 th
'New Star'	April 4 th	May 17 th
'Marvin'	April 9 th	May 7 th

2.4.- Fruit quality parameters

For each cultivar 18 homogeneous fruits were harvested at four ripening stages (S1 to S4), according to fruit colour and size. Cherry fruit at S1 were in the last growth phase having a light red color, while at S4 they have reached the commercial ripening stage to be harvested. Thus, S1-S4 corresponded to S11-S14 stages described for cherry fruit growth and ripening on tree by Serrano et al. (2005a). Fruit weight, firmness, and colour were measured individually in each fruit, and data are the mean \pm SE (n=18). Then, three subsamples of 6 fruits were made at random, and then the edible portion was cut in small pieces to obtain 3 homogenous subsamples for each cultivar and ripening stage, in which soluble solid content (TSS) and total acidity (TA) were determined. The weight for each fruit was determined using a digital balance (ST-360 Gram Precision, Spain) with two significant figures and results were the mean \pm SE. Fruit firmness was determined using a TX-XT2i Texture Analyzer (Stable Microsystems, Godalming, UK) interfaced to a personal computer, with a flat steel plate mounted on the machine. For each fruit, the cheek diameter was measured and then a force that achieved a 3% deformation of the fruit diameter was applied. Results were expressed as the ratio between this force and the covered distance (N mm^{-1}) and were the mean \pm SE. This determination of firmness as the slope of the force-



deformation curve has been chosen as the most characteristic parameter for textural changes in cherry fruits (Serrano *et al.*, 2005a; Muskovics *et al.*, 2006). Three colour determinations were made on each fruit at 120° interval along the equatorial perimeter using the Hunter Lab System (L*, a*, b*) in a Minolta colorimeter CR200 model (Minolta Camera Co., Osaka, Japan). TSS was determined in duplicate from the juice obtained from each subsample with a digital refractometer Atago PR-101 (Atago Co. Ltd., Japan) at 20°C and results expressed as the mean ± SE in °Brix. TA was determined from the above juice by potentiometric titration with 0.1 N NaOH (0.998 factor) up to pH 8.1, using 1 mL of diluted juice in 25 mL distilled H₂O according to Serrano *et al.* (2009). Results were the mean ± SE expressed as g of malic acid equivalent 100 g⁻¹ fresh weight.

2.5.- Statistical analysis

Data of flower bud density, flower buds drop, number of flower buds and total number of flowers per node, fruit set, percentage of double fruits, the colour determinations, the soluble solids, total acidity and firmness were statistically analysed by the general lineal model (GLM) using SAS GLM version 8 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Percentages were transformed by arcsine root square and ANOVA analysis was carried out. When necessary, an LSD test was used to determine differences between treatment means.

3.- Results and discussion

Full blooming dates (50% of flowers completely open) and harvest dates (commercial ripening stage) were recorded for all cultivars in the experimental fields, and average values from 2004 and 2005 are presented in Table 2. The latest cultivar to bloom was 'Marvin', which is the cultivar with more chilling requirements (1001 chill units, Alburquerque *et al.*, 2008). On the contrary, 'Cristobalina' had the lowest chilling requirements among the studied cultivars (397 chill units, Alburquerque *et al.*, 2008) and it flowered at middle March. However, harvest time was not related to blooming time, since it varied from middle April for the earlier cultivar 'Cristobalina', which was the earliest cultivar to flower, to middle-late May for 'Somerset and 'New Star', whereas the later cultivar to flower ('Marvin') was harvested at early May.



3.1.- Flower bud density

Flower bud density was not significantly different between cultivars (Table 3 and Fig. 1), suggesting that the flower bud density is not a genotype-dependent factor in sweet cherry. However a clear influence of genotype on flower bud production has been observed in peach and nectarine (Okie and Werner, 1996) as well as in some apricot cultivars (Alburquerque *et al.*, 2004; Ruiz and Egea, 2008).

Flower bud production was different among years. Contrary, flower bud density within apricot cultivars was not significantly affected by the year (Alburquerque *et al.*, 2004), although the climatic conditions were very different between years. The influence of the year observed in sweet cherry could be due to the fact that sweet cherry is more sensitive to temperature profiles during flower bud induction than other fruit *species*. Furthermore, the effect of the year on flower bud density was different for each variety, with the exception of 'Brooks', 'Burlat' and 'New Star'. Flower bud density of 'Marvin' was smaller in 2004 than in others years. For 'Cristobalina', 'Ruby' and 'Somerset' the higher flower bud production was observed in 2006. These results indicate that the effect of year on flower bud density is more accused in some cultivars than others.

3.2.- Number of flower buds per node and flower buds drop

The year and the cultivar significantly affected the number of flower buds per node (Table 3). The cultivars 'Brooks', 'Cristobalina', 'Marvin' and 'Ruby' showed the highest production of flower buds per node in the different years and for most of the cultivars this production was slightly high in 2006 (Fig. 2). Accordingly, Iezzoni and Mulinix (1992) found a high variability in the number of flower buds per node when they studied a sour cherry seedling collection.

Flower buds drop percentage was no different between cultivars, but a strong influence of the year was observed (Table 3). The highest percentages of bud drop were observed in 2004 and 2005 (Fig. 2). The interaction between cultivars and years was very significant, which is due to the different values of flower bud drop for each cultivar in different years. Flower bud abscission ranged between 0% ('Burlat' in 2007) and 31.82% ('New Star' in 2006) (Fig 2).



Table 3. P values obtained in the ANOVA for different flowering and fruits quality parameters in seven sweet cherry cultivars grown in southeast of Spain recorded in four consecutive years (2004-2007).

Source of variation	Degrees of freedom	P
<i>Flower bud density</i>		
Year	3	0.0001
Cultivar	6	0.2714
Year x Cultivar	14	0.0107
Error	120	
<i>Number of flower buds/ node</i>		
Year	3	0.0001
Cultivar	6	0.0001
Year x Cultivar	14	0.0001
Error	902	
<i>Flower buds drop</i>		
Year	3	0.0057
Cultivar	6	0.0890
Year x Cultivar	14	0.0001
Error	117	
<i>Total number of flower/ node</i>		
Year	3	0.0001
Cultivar	6	0.0001
Year x Cultivar	14	0.0001
Error	902	
<i>Fruit set</i>		
Year	2	0.0001
Cultivar	8	0.0001
Year x Cultivar	14	0.0006
Error	120	
<i>Double fruits</i>		
Year	2	0.2845
Cultivar	5	0.0001
Year x Cultivar	10	0.0161
Error	134	
<i>Fruit weight</i>		
Stage	3	0.0001
Cultivar	6	0.0001
Stage x Cultivar	18	0.0001
Error	160	
<i>Color index</i>		
Stage	3	0.0001
Cultivar	6	0.0001
Stage x Cultivar	18	0.0001
Error	57	
<i>Soluble solids</i>		
Stage	3	0.0001
Cultivar	6	0.0001
Stage x Cultivar	18	0.0001
Error	104	
<i>Total acidity</i>		
Stage	3	0.0001
Cultivar	6	0.0001
Stage x Cultivar	18	0.0001
Error	104	
<i>Ripening index</i>		
Stage	3	0.0001
Cultivar	6	0.0001
Stage x Cultivar	18	0.0001
Error	104	
<i>Fruit firmness</i>		
Stage	3	0.0001
Cultivar	6	0.0001
Stage x Cultivar	18	0.0001
Error	288	



Percentages of flower buds drop of sweet cherry cultivars recorded in this work are much lower than those observed in several apricot cultivars (Alburquerque *et al.*, 2004; Martínez-Gómez *et al.*, 2002; Ruiz and Egea, 2008), although there is not available information about flower buds drop in others sweet cherry cultivars for comparative purposes.

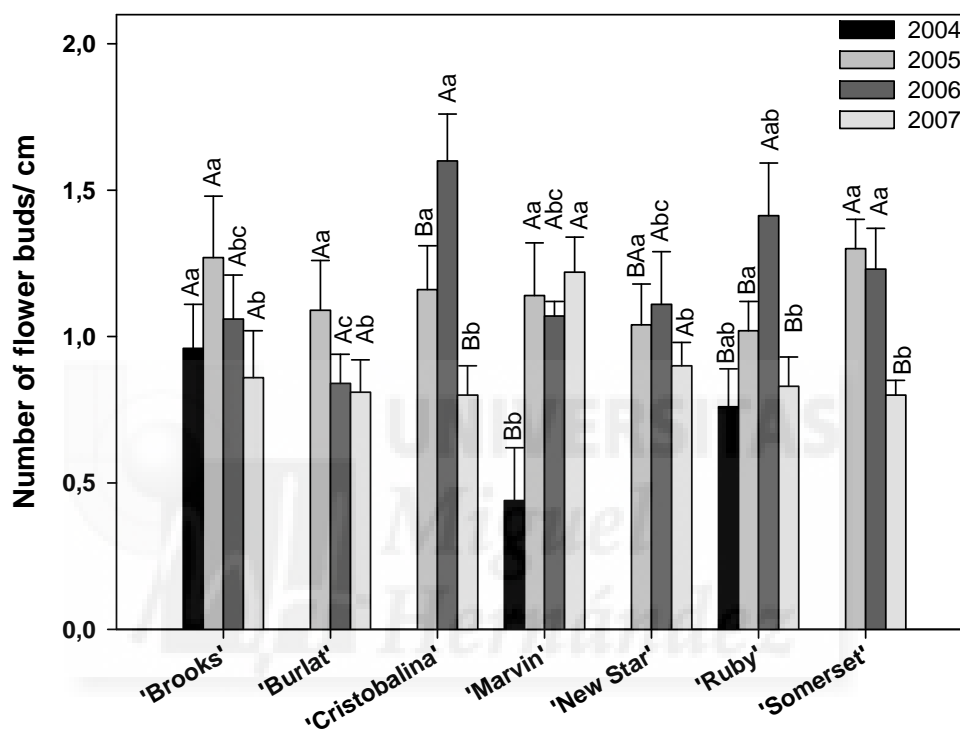


Figure 1.- Flower bud density (number of flower buds/cm) found in seven sweet cherry cultivars from 2004 to 2007. Data are average \pm S.E. Different capital letters represent differences between years for the same cultivar and lower-case letters represent differences between cultivars within the same year at 0.05 probability level (LSD test).

3.3.- Total number of flowers per node and fruit set

The statistical analysis of data indicates that cultivar and year had a strong influence on the total number of flowers per node (Table 3). In all cultivars the highest production of flowers per node was observed in 2006, with five cultivars



(‘Ruby’, ‘Brooks’, ‘Marvin’ ‘Cristobalina’ and ‘Somerset’) having more than 15 flowers per node in this year (Fig. 3).

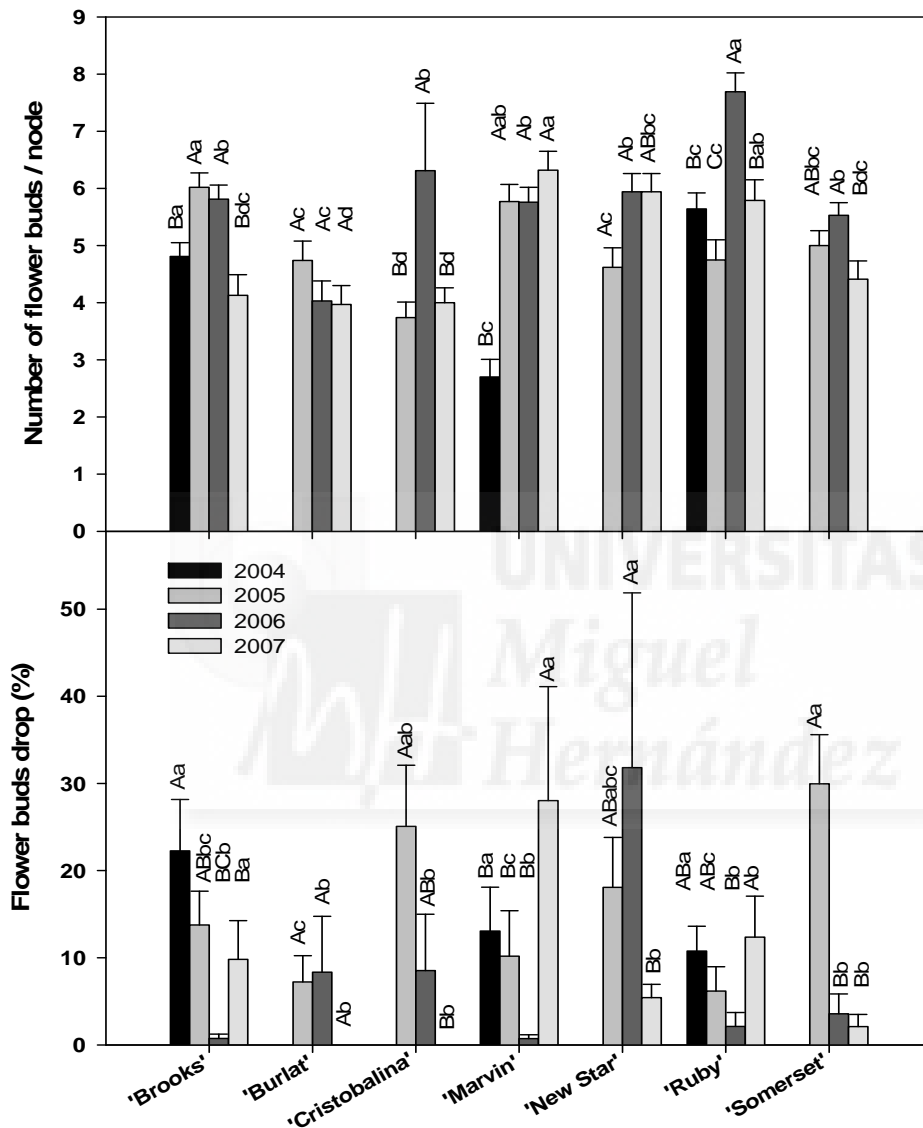


Figure 2. Number of flower buds per node and percentage of flower buds drop found in seven sweet cherry cultivars from 2004 to 2007. Different capital letters represent differences between years for the same cultivar and lower-case letters represent differences between cultivars within the same year at 0.05 probability level (LSD test).



Fruit set percentages were also strongly influenced by cultivar and year (Table 3), being 'New Star' and 'Cristobalina' the cultivars with the highest fruit set in 2005, 2006 and 2007 (over 30 %) (Fig. 3).

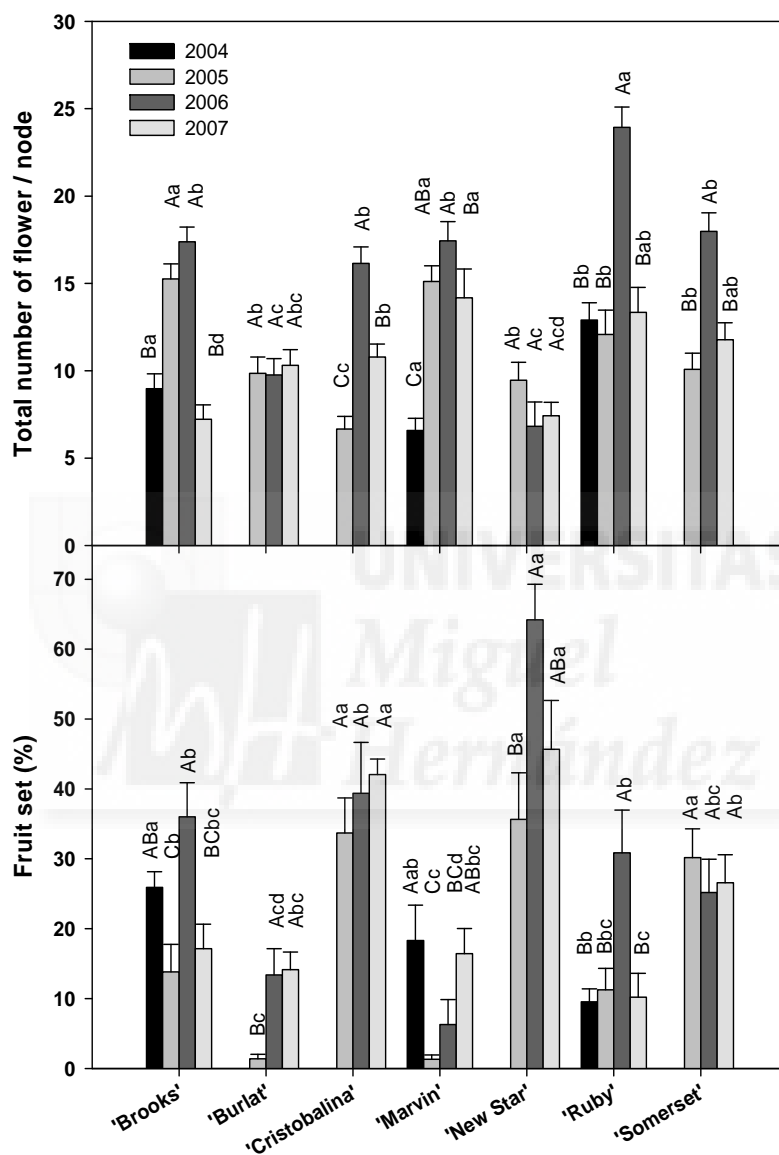


Figure 3.- Total number of flowers per node and fruit set (%) found in seven sweet cherry cultivars from 2004 to 2007. Different capital letters represent differences between years for the same cultivar and lower-case letters represent differences between cultivars within the same year at 0.05 probability level (LSD test).



In addition, there was a strong influence of the interaction cultivar and year on fruit set. Percentages in all cultivars with the exception of 'Cristobalina' and 'Somerset' varied with the year. However, a slightly increase of fruit set percentages was recorded in 2006 in many of the cultivars.

Many studies have examined the influence of climatic conditions at flowering on fruit set with detrimental effect of both, low and high temperatures. Thus, it is known that cold temperatures at flowering reduce the rate of pollen tube growth and may shorten the effective pollination period (Sanzol and Herrero, 2001), while a negative effect of high pre-blossom temperatures (≥ 27 °C) on ovule longevity and pollination effectiveness was pointed out by Caprio and Quamme (1998) as causing poor production in apple. The effect of high temperatures during flowering on pollen and pistil functions has been evaluated in detail in sweet cherry. Thus, Postweiler *et al.* (1985) described a negative effect of high temperatures on ovule viability. The duration of stigma receptivity was reduced at temperatures higher than 10 °C (20 and 30 °C) and pollen germination was also negatively affected at these temperatures (Hedhly *et al.*, 2003). Hedhly *et al.* (2004) studied the pollen tube dynamic in two sweet cherry cultivars founding a differential genotypic response to temperature, since high temperature (30 °C) increased the number of pollen tubes at the base of the style in 'Cristobalina' but it was reduced in 'Sunburst', which is adapted to a cooler climate. These results suggest that temperature during flowering could be a selective agent influencing positively pollen tube growth in those genotypes better adapted to warm climatic conditions. The high fruit production observed in 'Cristobalina' could reflect its adaptation to Mediterranean climatic conditions. However, the Canadian cultivar 'New Star' with high chilling requirements (909 chill units, Albuquerque *et al.*, 2008) had very high fruit set percentages. Therefore, differences in fruit production observed between 'New Star', 'Cristobalina' and the rest of cultivars could be due to their self compatibility status.

The year-to-year variation and differences among cultivars seem to indicate that there is a strong influence of climatic conditions and genotype on sweet cherry fruit set, as has been found in other studies (Choi and Andersen, 2001) and in different fruit species such as pear (Atkinson and Taylor, 1994; Atkinson and Lucas, 1996) or apricot (Albuquerque *et al.*, 2004; Ruiz and Egea, 2008).



3.4.- Double fruits

The percentages of double fruits were different between cultivars but not between years when averages of all cultivars are compared (Table 3). However, the interaction between cultivars and years was significant (Table 3), which means that the effect of the year on the double fruits production was different for some cultivars.

In 'Satohnishiki' sweet cherry cultivar double fruit production has been related to high temperatures during summer, when the sepal and petal differentiation occurs (Beppu *et al.*, 2001). Under our climatic conditions, summer temperatures do not influence equally the production of double fruits. Thus, the percentage of double fruits in 'Brooks' was higher in 2005 (9.8 ± 3.60) than in 2006 (0.7 ± 0.66) or 2007 (0.0 ± 0.00). However, the highest double fruit production of 'Somerset' was observed in 2007 (41.85 ± 12.77).

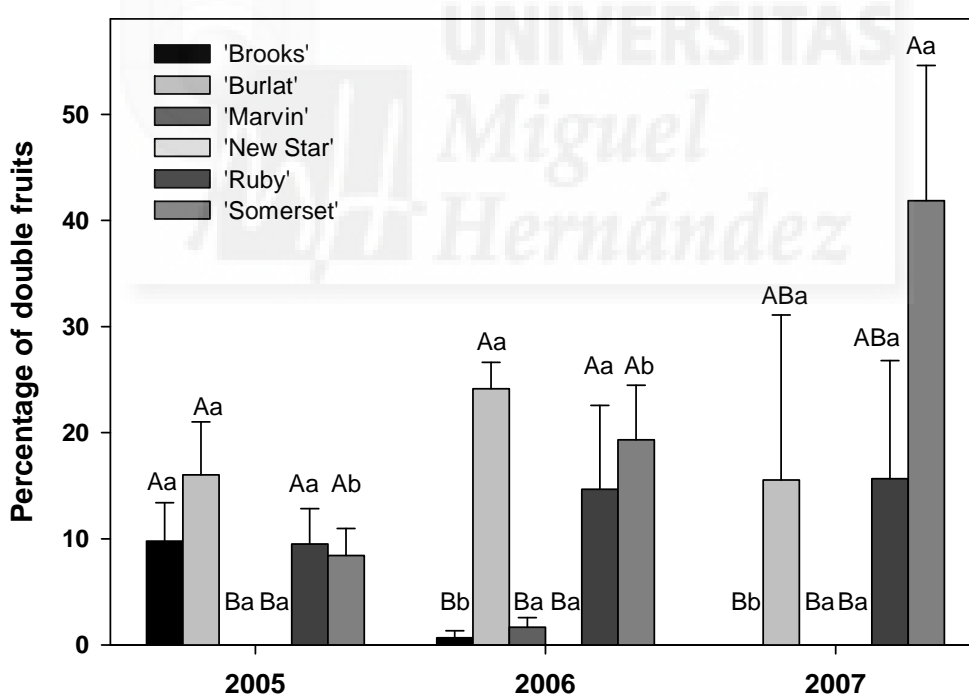


Figure 4. Percentages of double fruits observed in six sweet cherry cultivars calculated at Jumilla (Murcia) from 2005 to 2007. Different capital letters represent differences between cultivars for the same year and lower-case letters represent differences between years within the same cultivar at 0.05 probability level (LSD test).



The cultivars that consistently produced lower amount of double fruits were 'Marvin' and 'New Star' (Fig. 4). Thus, our results seem to indicate that double fruit production has a strong genetic influence, accordingly with Roversi *et al.* (2008).

Caprio and Quamme (2006) found that rainfall during fruit development and harvest of sweet cherry reduced production because of rain-induced cracking. However, no cracking sensitivity was observed in the studied sweet cherry cultivars under our climatic conditions, probably due to scarce rainfall during maturity fruit period.

3.5.- Fruit quality parameters

It is known that environmental factors and orchard management (choice of rootstock, pruning, fertilisation and irrigation) affect cherry fruit quality, in terms of different concentration of nutritive and bioactive compounds (Predieri *et al.*, 2004; Gonçalves *et al.*, 2006). However, in this work all cherry cultivars were in very close farms, under similar environmental conditions and cultural practices. Trees were of the same age and grafted onto the same rootstock. Therefore, differences in quality parameters between cultivars that will be commented below should be attributed to genetic characteristics of each cultivar.

Fruit weight was very different between cultivars and stages (Table 3). 'New Star' showed the largest fruit in all stages, whereas 'Cristobalina' had the smallest fruits (Fig. 5). At the commercial stage (S4) the values were 12.70 ± 0.54 g for 'New Star' and 7.26 ± 0.30 g for 'Cristobalina'.

In sweet cherry, the ripening process is characterized by colour changes, from green to red, which can be followed by the evolution of L^* , a^* and b^* parameters and the colour indices Chroma and Hue. The colour index (a^*/b^*) has been proposed as a good colour index for sweet cherry cultivars (Díaz-Mula *et al.*, 2009), since it shows a continuous increase during fruit ripening on the tree and has been used in other species such as apple, pear and peach. In accordance our results show an increase from S1 to S4 in all the studied cultivars in this paper (Fig. 5), although important differences were found between them (Table 3). Thus, the highest value at S4 stage was found for 'Marvin' (4.31 ± 0.18) and the lowest for 'New Star' (2.95 ± 0.13), showing the darkest red and the lightest red colour, respectively. Moreover, taking into account the relationship between a^*/b^* index and total anthocyanin concentration in sweet cherry cultivars (Díaz-Mula *et al.*,



2009), great variations between cultivars would exist in anthocyanin concentration leading to differences in antioxidant activity and health beneficial effects (Scalbert *et al.*, 2005; Díaz-Mula *et al.*, 2009; Serrano *et al.*, 2009).

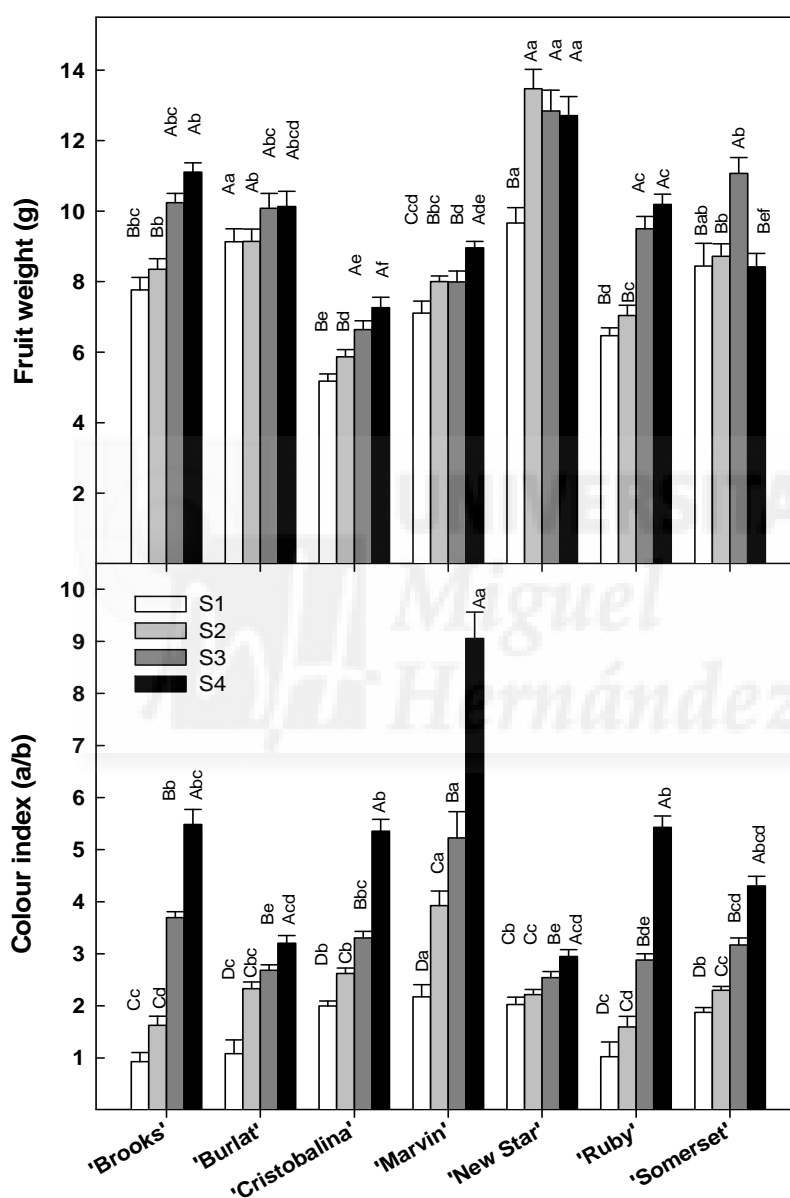


Figure 5. Fruit weight and colour index (a/b) evolution from S1 to S4 in seven sweet cherry cultivars. Data are average \pm S.E. Different capital letters represent differences between stages for the same cultivar and lower-case letters represent differences between cultivars within the same stage at 0.05 probability level (LSD test).



Total soluble solids increased from S1 to S4 in all sweet cherry cultivars, with values at S4 ranging from ≈ 12 °Brix in 'Burlat' to ≈ 20.5 °Brix in the cultivars 'Brooks' and 'Ruby' respectively (Fig. 6).

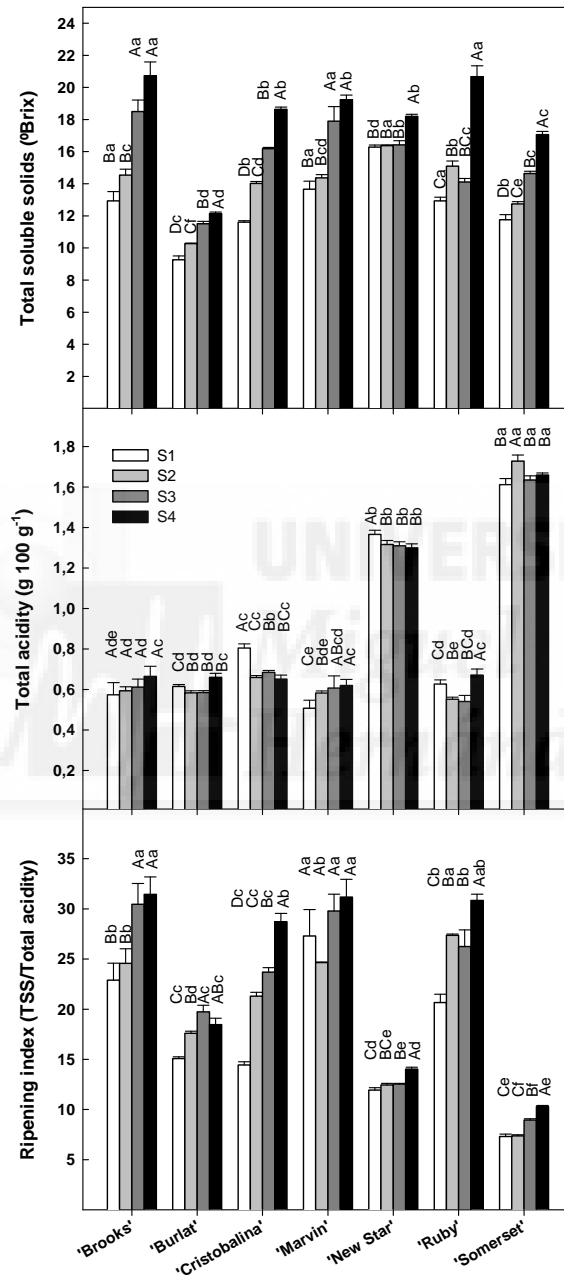


Figure 6. Total soluble solids, total acidity and ripening index evolution from S1 to S4 in seven sweet cherry cultivars. Data are average \pm S.E. Different capital letters represent differences between stages for the same cultivar and lower-case letters represent differences between cultivars within the same stage at 0.05 probability level (LSD test).



In general, these cultivars have high content of total soluble solids, since in other sweet cherry cultivars, harvested at commercial ripening stage, values between 11 and 25 °Brix have been reported (Girard and Kopp, 1998; Esti *et al.*, 2002; Serrano *et al.*, 2005a and b). The main sugars found in cherry cultivars have been glucose and fructose, followed by sorbitol and sucrose (Girard and Kopp, 1998; Serrano *et al.*, 2005a; Usenik *et al.*, 2008). Important differences were also found in total acidity among sweet cherry cultivars (Table 3).

Thus, the highest values were found in 'Somerset', ($\approx 1.6 \text{ g} \times 100 \text{ g}^{-1}$) followed by 'New Star' ($\approx 1.3 \text{ g} \times 100 \text{ g}^{-1}$) and the remaining cultivars showed values of 0.6-0.7 $\text{g} \times 100 \text{ g}^{-1}$ (Fig.6).

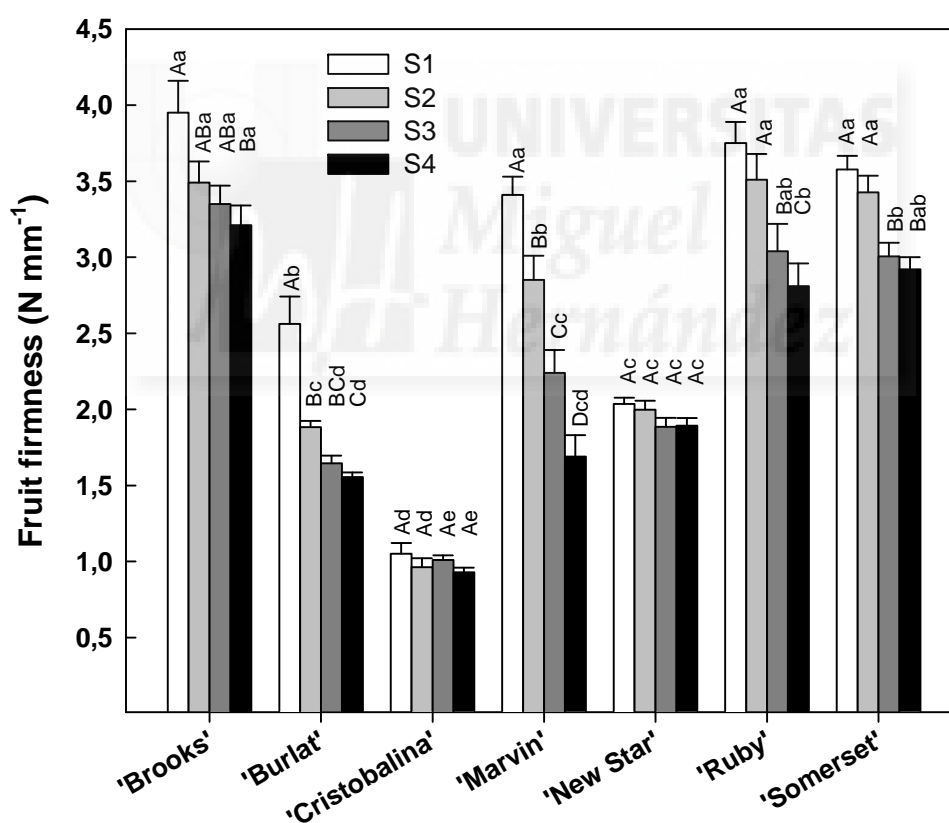


Figure 7. Fruit firmness evolution from S1 to S4 in seven sweet cherry cultivars. Data are average \pm S.E. Different capital letters represent differences between stages for the same cultivar and lower-case letters represent differences between cultivars within the same stage at 0.05 probability level (LSD test).



However, in stone fruits other than cherries, such as nectarines (Iglesias and Echevarría, 2009) and peach (Byrne *et al.*, 1991) acidity decreased over the development and ripening, while an accumulation was observed but not in all cultivar tested, in agreement with the reported increase in total acidity as harvesting date was delayed in 'Lapins' and '4-70', also called 'Marvin', cherries (Drake and Elfving, 2002; Serrano *et al.*, 2005a).

Nevertheless, for sweet cherry the ratio soluble solids/total acidity has been proposed as determining consumer acceptance (Crisosto *et al.*, 2003). This ratio increased along the ripening process on tree (from S1 to S4) in all sweet cherry cultivars, with the highest values being reached in 'Brooks', 'Marvin' and 'Ruby' cultivars and the lowest in 'New Star' and 'Somerset' (Fig. 6).

Fruit firmness is also an attribute very appreciated by consumers although there are considerable genotypic differences (Table 3), as can be observed in Fig. 7, with firmness levels at S4 ranging from $\approx 1 \text{ N} \times \text{mm}^{-1}$ in 'Cristobalina' to $\approx 3.20 \text{ N} \times \text{mm}^{-1}$ in 'Brooks'. Softening in the last days of ripening of sweet cherry has been attributed to increases in β -galactosidase activity, unlike in most of fruits, in which softening is dependent on pectin depolymerization due to polygalacturonase activity (Gerardi *et al.*, 2001; Batische *et al.*, 1996).

References

- Alburquerque N., Burgos L., Egea J. (2004). Influence of flower bud density, flower bud drop and fruit set on apricot productivity. *Sci Horti -Amsterdam* **102** : 397-406.
- Alburquerque N., García-Montiel F., Carrillo A., Burgos L. (2008). Chilling and heat requirements of sweet cherry cultivars and the relationship between altitude and the probability of satisfying the chill requirements. *Environ. Exp. Bot.* **64**: 162-170.
- Atkinson C.J., Lucas A. S. (1996). The response of flowering date and cropping of *Pyrus communis* cv Concorde to autumn warming. *J. Horti. Sci.* **71**: 427-434.
- Atkinson C.J., Taylor L. (1994). The influence of autumn temperature on flowering time and cropping of *Pyrus communis* cv conference. *J. Horti. Sci.* **69**: 1067-1075.
- Baggiolini M. (1952) Stade repères du pecher. *Revue Romande d'Agriculture, Viticulture et Arboriculture* **4**: 29



- Batisse C., Buret, M., Coulomb, P. J.** (1996). Biochemical differences in cell wall of cherry fruit between soft and crisp fruit. *J. Agric. Food Chem.* **44**: 453-457.
- Bellini E., Gianelli G.** (1975). Sul valore tassonomico di alcuni caratteri del ramo nel pesco. *Riv. Ortoflorofrutt. It.* **59**: 440-458.
- Beppu K., Ikeda T., Kataoka I.** (2001). Effect of high temperature exposure time during flower bud formation on the occurrence of double pistils in 'Satohnishiki' sweet cherry. *Sci Horticulture -Amsterdam* **87**: 77-84.
- Burgos L., Egea J.** (1993). Apricot embryo-sac development in relation to fruit set. *J. Horticulture. Sci.* **68**: 203-208.
- Byrne, D. H., Nikolic, A. N., Burns, E. E.** (1991). Variability in sugars, acids, firmness and colour characteristics of 12 peach genotypes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **116**: 1004-1006.
- Caprio J.M., Quamme H.A.** (1998). Weather conditions associated with apple production in the Okanagan Valley of British Columbia. *Can. J. Plant. Sci.* **79**:129-137.
- Caprio J. M., Quamme H.A.** (2006). Influence of weather on apricot, peach and sweet cherry production in the Okanagan Valley of British Columbia. *Can. J. Plant Sci.* **86**, 259-267.
- Choi C., Andersen R.** (2001). Variable fruit set in self-fertile sweet cherry. *Can. J. Plant Sci.* **81**: 753-760.
- Crisosto C. H., Crisosto G. M., Metheney P.** (2003). Consumer acceptance of 'Brooks' and 'Bing' cherries is mainly dependent on fruit SSC and visual skin color. *Postharvest Biol. Technol.* **28**: 159-167.
- Díaz-Mula H.M., Castillo S., Martínez-Romero D., Valero, D., Zapata, P.J., Guillén, F., Serrano, M.** (2009). Organoleptic, nutritive and functional properties of sweet cherry as affected by cultivar and ripening stage. *Food Sci. Tech. Intl.* **15**: 535-544.
- Drake S. R., Elfving D.C.** (2002). Indicators of maturity and storage quality of 'Lapins' sweet cherry. *HortTech* **12**: 687-690.
- Esti M., Cinquante L., Sinesio F., Moneta E. And Matteo M.** (2002). Physicochemical and sensory fruit characteristic of two sweet cherry cultivars after cool storage. *Food Chemistry* **76**: 399-405.
- Furukawa Y., Bukovac M.J.** (1989). Embryo sac development in sour cherry during the pollination period as related to fruit set. *HortScience* **24**: 1005-1008.



- Gerardi C., Blando F., Santino A., Zacheo G.** (2001). Purification and characterisation of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *Plant Sci.* **16**: 795-805.
- Girard B., Kopp T. G.** (1998). Physicochemical characteristics of selected sweet cherry cultivars. *J. Agr. Food Chem.* **46**: 471-476.
- Gonçalves B., Moutinho-Pereira J., Santos A., Silva A.P., Barcelar E., Correira C., Rosa, E.** (2006). Scion-rootstock interaction affects the physiology and fruit quality of sweet cherry. *Tree Physiology* **26**: 93-104.
- Guerriero R., Viti R., Bartolini S.** (1985). Winter changes in the appearance of flower cup anomalies in an italian late blooming variety. *Acta Hort* **192**: 49-56.
- Guitian J.** (1993). Why *Prunus mahaleb* (Rosaceae) produces more flowers than fruits. *Am. J. Bot.* **80**: 1305-1309.
- Hedhly A., Hormaza J.I., Herrero M.** (2003). The effect of temperature on stigmatic receptivity in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant, Cell and Environment* **26**: 1673-1680.
- Hedhly A., Hormaza J.I., Herrera M.** (2004). Effect of temperature on pollen tube kinetics and dynamics in sweet cherry, *Prunus avium* (Rosaceae). *Am. J. Bot.* **91**: 558-564.
- Iezzoni A.F., Mulinix C.A.** (1992). Yield components among sour cherry seedlings. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **117**: 380-383.
- Iglesias, I., Echevarria, G.** (2009). Differential effect of cultivar and harvest date on nectarine colour, quality and consumer acceptance. *Sci Hort - Amsterdam* **102**: 41-50.
- Legave J.M.** (1975). La differenciation du bourgeon a fleur et le repos hivernal chez l'abricotier (*Prunus armeniaca Vulgaris*). *La Pomologie Francaise* **17**: 150-168.
- Legave J.M., García G., Marco F.** (1982). Some descriptive aspects of drops process of flower buds, or young flowers observed on apricot tree in south of France. *Acta Hort.* **121**: 75-83.
- Lichou, J., Edin, M., Tornel, C. y Saunier, R.** (1990). Le cerisier : la cerise du table. *Ed. Ctifl.* pp: 35-70.
- MAPYA** (2008). Anuario de estadística. M. M. Ambiente y Medio Rural y Marino. <http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/introduccion.htm>
- Martínez-Gómez P., Dicenta F., Ruiz D., Egea J.** (2002). Flower bud abscission in apricot: competition between vegetative and flower buds, and effects of early



- defoliation and high pre-blossom temperatures. *J. Hortic. Sci. Biotec.* **77**: 485-488.
- Muskovics G., Felföldi J., Kovács E., Perlaki R., Kállay T.** (2006). Changes in physical properties during fruit ripening of Hungarian sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Postharvest Biol. Tech.* **40**: 56-63.
- Okie W.R., Werner D.J.** (1996). Genetic influence on flower bud density in peach and nectarine exceeds that of environment. *HortSci.* **31**: 1010-1012.
- Predieri S., Dris R., Rapparini F.** (2004). Influence of growing conditions on yield and quality of cherry: II. Fruit quality. *Food, Agric. and Env.* **2**: 307-309.
- Postweiler K., Stösser R., Anvari S.F.** (1985). The effect of different temperatures on the viability of ovules in cherries. *Sci Hortic -Amsterdam* **25**: 235-239.
- Richardson E.A., Seeley S.D., Walker D.R.** (1974). A model for estimating the completion of rest for 'Redhaven' and 'Elberta' peach trees. *HortSci.* **1**: 331-332.
- Romano G.S., Cittadini E.D., Pugh B., Schouten R.** (2006). Sweet cherry quality in the horticultural production chain. *Stewart Postharvest Review* **6**:2.
- Roversi, A., Fajt, N., Monteforte, A., Folini, L., Panelli, D.** (2008). Observations on the occurrence of sweet cherry double-fruits in Italy and Slovenia. *Acta Hort.* **795**: 849-854.
- Ruiz D., Egea J.** (2008). Analysis of the variability and correlations of floral biology factors affecting fruit set in apricot in a Mediterranean climate. *Sci Hortic -Amsterdam* **115**: 154-163.
- Sanzol J., Herrero M.** (2001). The "effective pollination period" in fruit trees. *Sci Hortic -Amsterdam* **90**: 1-17
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L.** (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Review Food Science and Nutrition* **45**: 287-306.
- Serrano M., Díaz-Mula H.M., Zapata P.J., Castillo S., Guillén F., Martínez-Romero D., Valverde J.M., Valero D.** (2009). Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars. *J. Agr. Food Chem.* **57**: 3240-3246.
- Serrano M., Guillén F., Martínez-Romero D., Castillo S., Valero D.** (2005a). Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *J. Agr. Food Chem.* **53**: 2741-2745.



- Serrano, M., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Guillén, F. y Valero, D.** (2005b). The use of natural antifungal compounds improves the beneficial effects of MAP in sweet cherry storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **6**: 115-123.
- Usenik V., Fabčič J., Stämpar F.** (2008). Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem.* **107**: 185-192.





DISCUSIÓN GENERAL



DISCUSION GENERAL

1. Necesidades de frío y calor para florecer

Como se ha indicado en este trabajo existe un creciente interés por las posibilidades de cultivar el cerezo en zonas donde la maduración pueda anticiparse, con respecto a las tradicionales, dados los elevados precios que la cereza temprana puede llegar a conseguir. Nuestra Región cuenta con unas condiciones climáticas excelentes para salir con adelanto en la época de maduración, aunque es necesario disponer de variedades adecuadas, que no tengan muchas necesidades de frío para completar su reposo invernal y evitar así problemas productivos. En los últimos años han sido registradas diferentes variedades susceptibles de adaptarse a nuestras condiciones climáticas. Es necesario estudiar los distintos aspectos de estas variedades y otras muchas que podrían resultar interesantes para su cultivo o como genitores en un programa de mejora. En este sentido se han estimado las necesidades de frío y de calor para florecer de las variedades objeto de estudio en esta Tesis. La variedad que mostró menos necesidades de frío fue 'Criatobalina' de floración temprana. También la variedad 'Brooks' registró bajos requerimientos de frío, coincidiendo este resultado con los indicados por algunos autores (Marsall, 1990; Herraiz, 1992; Ballester, 1992). 'Burlat', 'Ruby' y 'Somerset' tienen una necesidad de frío intermedias y las más elevadas se observaron en 'New Star' y 'Marvin'. Tersoglio *et al.* (2006) obtuvieron resultados similares cuando calcularon las necesidades de frío de las variedades 'Ruby' y 'Marvin' mediante el modelo UTA y en el caso de 'Burlat', las porciones necesarias para satisfacer el requerimiento de frío fueron similares a las calculadas en nuestras condiciones climáticas (Erez, 2000).

Las necesidades de calor para florecer de las variedades objeto de estudio son en general elevadas cuando se comparan con las estimadas en otras especies de *Prunus* como almendro (Egea *et al.*, 2003; Alonso *et al.*, 2005). En estos estudios, algunas variedades de almendro, como 'Desmayo Langueta', 'Constantini' o 'Pou de Felanitx', tenían unos requerimientos inferiores a 6000 GDHs. Los datos presentados en el capítulo 1 de esta Tesis muestran que los requerimientos de calor se encuentran en un rango muy estrecho, con un ligero incremento en la variedad de floración tardía 'Marvin'. Spiegel-Roy y Alston (1979) sugirieron que



los requerimientos de frío y de calor en el peral (*Pyrus communis* L.) están estrechamente relacionados con el tiempo de floración, aunque en otros casos se ha encontrado que los requerimientos de frío y de calor son interdependientes (Couvillon and Erez, 1985), e incluso en diferentes variedades de melocotón, existe una relación inversa entre el efecto de la acumulación de horas frío y calor (Citadin *et al.*, 2001). Así, mayores exposiciones a frío conducen a una reducción de los requerimientos de calor. Por otra parte, en almendros se ha encontrado que los requerimientos de calor son más importantes para inducir la floración que los requerimientos de frío en las condiciones climáticas de Zaragoza (Nor-Este de España), debido a que los requerimientos de frío se completan pronto en estos frutales (Alonso *et al.*, 2005). Sin embargo, en el sureste de España el tiempo de floración en algunas variedades de almendro se ha visto más influenciado por los requerimientos de frío que por los de calor (Egea *et al.*, 2003). De acuerdo con esto, los datos presentados en esta Tesis sugieren que las diferencias en los requerimientos de frío tienen mayor influencia en las fechas de floración que los de calor en las diferentes variedades de cereza, en las condiciones climáticas de Murcia, y que la fecha de floración media, de los dos años estudiados fue más temprana en las variedades con bajos requerimientos de frío, pero no en los de bajos requerimientos de calor, mientras que las variedades de floración tardía mostraron los mayores requerimientos de frío y de calor para florecer.

Los resultados muestran que las diferentes variedades de cerezo tienen un amplio rango de requerimientos de frío y que podrían cultivarse en zonas específicas de la Región de Murcia. La acumulación de horas frío se ve afectada por la localización geográfica, especialmente por la altitud en regiones tropicales y subtropicales (Ou y Chen, 2000). En este sentido, se ha encontrado una relación positiva entre acumulación de frío y altitud de las diferentes áreas de la Región de Murcia. Así, las probabilidades de satisfacer las necesidades de frío se ha estimado usando la información climática de varios años y se pone de manifiesto que las variedades 'Cristobalina', 'Brooks', 'Ruby', 'Burlat' y 'Somerset' podrían cultivarse con elevada probabilidad de satisfacer sus necesidades de frío en muchas zonas de la región, mientras que 'New Star' y, sobretudo, 'Marvin' deberían cultivarse sólo en las zonas de mayor altitud para evitar los problemas relacionados con la falta de frío. Esto se confirma por el hecho de que todas las variedades cultivadas en la estación experimental, a 360 m sobre el nivel del mar, florecieron sin problemas, excepto 'Marvin', que mostraba con frecuencia floración y rendimiento



irregulares. Por tanto, resulta evidente que el conocimiento de la relación entre altitud y acumulación de frío en diferentes áreas de la Región de Murcia, o de otras localizaciones, es de suma importancia para decidir la variedad de cerezo más adecuada que se ha de plantar y que es necesario realizar más investigaciones con otras variedades para estimar sus requerimientos de frío y de calor para conocer su posible adaptación a áreas en las que no se han cultivado de forma tradicional.

2. Efecto de la conservación a bajas temperaturas sobre la viabilidad del polen

En el capítulo 2 de esta Tesis, los estudios realizados sobre la viabilidad del polen pusieron de manifiesto que existen diferencias entre variedades, pero también entre la temperatura y el tiempo de almacenaje. Cuando se analizaron los datos de cada variedad independientemente se comprobó que 'Cristobalina' era la variedad que presentaba mayor viabilidad del polen, sobre el 60%, mientras que en las demás variedades oscilaba entre 35.98% y 43.76%. Estos porcentajes son relativamente bajos en comparación con los publicados por Bargioni y Cossio (1980) quienes encontraron valores del 70 y 80%. Sin embargo, de acuerdo con nuestros datos, Hedhly *et al.* (2005), estudiaron la germinación del polen de nueve variedades de cerezo *in vitro* en dos regímenes de temperatura, 15° y 30°C, encontrando un efecto significativo del genotipo y de la temperatura de almacenaje. Así, la temperatura mayor reducía la germinación del polen, con unos valores del 40% en 'Talaguera Brillante' y 'Ambrunés' y del 70% en 'Van' y 'Bing'. Resultados similares se obtuvieron por Hormaza y Herrero (1999) con diferentes variedades de cerezo y con otras especies del género *Prunus* como el albaricoquero (Egea *et al.*, 1992) o el almendro (Martínez-Gómez *et al.* 2002).

En los resultados presentados en esta Tesis, en la mayoría de las variedades la variabilidad del polen disminuía después de 15 ó 30 días de almacenaje a 4 °C y se perdía completamente después de sólo 60 días de almacenaje a esa temperatura, aunque 'Cristobalina' y 'New Star' mantenían un porcentaje relativamente alto de polen viable después de un mes de conservación. Por el contrario, en la mayoría de las variedades el porcentaje de germinación del polen no se modificaba después de un año de almacenaje a -20 °C.

Fogle (1975) y Brown *et al.* (1996) indicaron que el congelado o el liofilizado de los granos de polen retrasa las pérdidas de viabilidad y así, el polen puede ser



almacenado durante varios años. En nuestro caso, la viabilidad del polen se mantenía inalterada durante más de un año a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en las variedades 'Cristobalina' y 'Somerset'. Sin embargo, en las variedades 'New Star', 'Marvin', 'Brooks' y 'Ruby' se redujo aproximadamente a la mitad después de 540 días de almacenaje a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Asimismo, Griggs *et al.* (1953) encontraron un descenso en el porcentaje de germinación del polen después de 400 días de almacenaje a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ en las variedades 'Black Tartarian' y 'Napoleon'. Por tanto, se puede concluir que la variedad del polen de cerezo puede verse mermada por largos períodos de almacenaje a temperaturas de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, aunque la magnitud de este efecto es dependiente del genotipo.

En otros frutales como el almendro se ha comprobado que la viabilidad del polen también disminuye después de 8 semanas de almacenaje a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Martínez-Gómez *et al.*, 2000), mientras que si el almacenaje se realiza a temperaturas de congelación (-20 ó $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) no se modificaba después de un año (Martínez-Gómez *et al.*, 2002). Sin embargo, en otras especies como el chirimoyo la viabilidad del polen se reducía progresivamente con el tiempo de almacenaje a temperaturas bajo cero (-20 , -80 y $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), alcanzando un mínimo después de 90 días, y sin diferencias significativas entre las tres temperaturas después de 30 días de almacenaje (Lora *et al.*, 2006).

Los datos presentados en el capítulo 2 de esta Tesis permiten concluir que el almacenaje a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ del polen de las variedades 'Cristobalina', 'Brooks', 'Somerset' y 'Ruby' durante un año no afecta a su viabilidad, mientras que ésta se reduce considerablemente en las demás variedades estudiadas. Este es el primer estudio realizado con estas variedades sobre viabilidad del polen después de su almacenaje durante largos períodos de tiempo, ya que éstas son variedades procedentes de programas de mejora relativamente recientes encaminados a la selección de variedades auto-compatibles y de maduración temprana para ser cultivadas en el sureste español. Por tanto, los resultados indican que es necesario conocer el procedimiento más adecuado para conservar la viabilidad del polen de las diferentes variedades y así, poder planificar polinizaciones controladas en futuros programas de mejora.



3. Diferentes aspectos de la biología floral, del cuajado y maduración de los frutos

En el capítulo 3 se recoge un estudio comparativo realizado con las siete variedades de cerezo objeto de estudio en, al menos, tres años consecutivos. La fecha de plena floración se consideró aquella en la que el 50% de las flores estaban totalmente abiertas y según los datos obtenidos en 2004 y 2005 la variedad de floración más tardía fue 'Marvin', que es el que más requerimientos de frío mostró para inducir la floración, según los resultados de los estudios reflejados en el capítulo 1 (1001 unidades de frío, Albuquerque *et al.*, 2008). Por el contrario, 'Cristobalina' era la variedad con menores requerimientos de frío (397 unidades de frío, Albuquerque *et al.*, 2008) y su fecha de floración fue mediados de marzo. Sin embargo, la fecha de recolección comercial no guardó relación con la fecha de floración, puesto que osciló desde mediados de abril para la variedad 'Cristobalina', que fue el más precoz tanto en floración como en alcanzar la maduración, hasta la última semana de mayo para las variedades 'Somerset' y 'New Star', mientras que la última variedad para florecer fue 'Marvin' y se recolectó a principios de mayo. Así pues, el tiempo necesario para que el fruto se desarrolle y alcance su madurez comercial es una característica de la variedad e independiente de la precocidad de la floración, oscilando entre 54 y 83 días, según otros estudios realizados con un amplio rango de variedades (Díaz-Mula *et al.*, 2010).

La densidad de floración fue similar en todas las variedades estudiadas, sugiriendo que este carácter no es dependiente del genotipo en cerezo. Sin embargo, la formación de yemas florales sí es dependiente de la variedad en melocotones y nectarinas (Okie and Werner, 1996) así como en diferentes variedades de albaricoque (Albuquerque *et al.*, 2004; Ruiz and Egea, 2008). Por el contrario la formación de yemas florales varió entre los diferentes años estudiados en todas las variedades de cerezo excepto en 'Brooks', 'Burlat' y 'New Star', lo que parece indicar que el efecto del año en la densidad de floración es más acusado en unas variedades que en otras.

El número de yemas florales por ramillete de Mayo también fue diferente entre variedades y entre los años estudiados. Las variedades 'Brooks', 'Cristobalina', 'Marvin' y 'Ruby' mostraron el mayor número de yemas florales por ramillete en todos los años y para la mayoría de las variedades este número fue más alto en el año 2006. Asimismo, Iezzoni y Mulinix (1992) encontraron una



alta variabilidad en el número de yemas florales por nudo en una colección de variedades de guindo.

Sin embargo, el porcentaje de caída de yemas florales fue similar en todas las variedades, aunque sí se observó una elevada variación entre años, siendo los porcentajes de caída más elevados en 2004 y 2005. Además, la interacción entre variedades y años fue muy significativa, debido a los diferentes valores que se obtuvieron para cada variedad en los distintos años. En cualquier caso los porcentajes observados fueron mucho más bajos que los encontrados en diferentes variedades de albaricoque (Alburquerque *et al.*, 2004; Martínez-Gómez *et al.*, 2002; Ruiz y Egea, 2008), aunque no hay información disponible sobre otras variedades de cereza con las que se puedan comparar los datos obtenidos en este estudio.

El número total de flores por nudo o por ramillete de Mayo también presentó diferencias significativas entre las distintas variedades y años de estudio. En todas las variedades el número de flores por nudo más elevado se encontró en 2006 y las variedades 'Ruby', 'Brooks', 'Marvin', 'Cristobalina' y 'Somerset' registraron los valores más altos.

Igualmente el porcentaje de frutos cuajados fue afectado por la variedad y el año, siendo las variedades autocompatibles 'New Star' y 'Cristobalina' las que presentaron un mayor porcentaje de frutos cuajados en los tres años analizados. En todas las variedades los valores más elevados fueron observados en 2006. En muchos estudios se ha examinado la influencia de las condiciones climáticas durante el momento de la floración sobre el cuaje del fruto, observándose efectos perjudiciales tanto de las altas como de las bajas temperaturas. Así, en manzano, las temperaturas bajas reducen la tasa de crecimiento del tubo polínico y acortan el período de polinización efectiva (Sanzol and Herrero, 2001), mientras que temperaturas elevadas (≥ 27 °C) reducen la longevidad del óvulo y también disminuyen el período de polinización efectiva (Caprio y Quamme, 1998) y por tanto, la producción total. El efecto de la elevada temperatura durante la floración en las funciones del polen y del pistilo se ha evaluado en detalle en cerezo. Así, Postweiler *et al.* (1985) describieron un efecto negativo en la viabilidad del óvulo y también se ha descrito un efecto negativo sobre la germinación del polen (Hedhly *et al.*, 2003).

En cualquier caso, las diferencias entre los distintos años y entre las diferentes variedades indican que existe una fuerte influencia de las condiciones climáticas y del genotipo en el cuaje del fruto en el cerezo, de acuerdo con trabajos



previos realizados con otras variedades de esta especie (Choi y Andersen, 2001) y con otras especies como peral (Atkinson y Taylor, 1994; Atkinson y Lucas, 1996) y albaricoque (Albuquerque *et al.*, 2004; Ruiz y Egea, 2008).

El porcentaje de frutos dobles fue diferente entre variedades, pero no entre años, si se comparan los datos de las variedades estudiadas ('Brooks', 'Burlat', 'Marvin', 'New Star', 'Ruby' y 'Somerset') y los años analizados. En otras variedades, como 'Satohnishiki' la formación de frutos dobles se ha relacionado con elevadas temperaturas durante el verano cuando se produce la diferenciación de los sépalos y pétalos de la flor (Beppu *et al.*, 2001). Sin embargo, en nuestras condiciones climáticas las temperaturas elevadas del verano no tuvieron el mismo efecto en todas las variedades, puesto que la interacción entre variedades y años fue significativa, lo que indica que el efecto de la temperatura de cada año fue diferente para cada variedad. Por otra parte, las variedades que produjeron mayor número de frutos dobles todos los años analizados fueron 'Marvin' and 'New Star' lo que sugiere que la producción de frutos dobles tiene una fuerte influencia genética, tal y como indicaron recientemente Roversi *et al.* (2008).

El fenómeno de rajado de los frutos que deprecia enormemente el valor comercial de las cerezas se ha asociado a lluvias abundantes en las últimas fases del desarrollo del fruto (Caprio y Quamme, 2006). Sin embargo, no se ha observado este problema en ninguna de las variedades durante los años de estudio, probablemente debido a que, en nuestras condiciones climáticas, las lluvias no son muy importantes durante el periodo de maduración de los frutos.

Con respecto a los parámetros relacionados con la calidad de la cereza, hay que señalar que se ven influenciados por las condiciones ambientales y por las prácticas de cultivo, incluyendo porta-injertos, fertilización, plaguicidas, etc., ya que se puede modificar la concentración de diferentes compuestos nutritivos y bioactivos (Predieri *et al.*, 2004; Gonçalves *et al.*, 2006). Sin embargo, en los resultados presentados en el capítulo 3 de esta Tesis todas las variedades de cerezo se encontraban en explotaciones muy próximas, bajo condiciones ambientales similares y también bajo las mismas prácticas agronómicas e injertadas en el mismo patrón. Por tanto, las diferencias en los parámetros de calidad que se encontraron entre los frutos de las distintas variedades deben de ser atribuidas a las características genéticas de cada variedad.

El peso es un parámetro de calidad muy importante en la cereza, ya que los frutos de mayor tamaño son más apreciados por los consumidores. En este



parámetro, se encontraron diferencias entre las variedades, siendo los frutos más pequeños los de 'Cristobalina' y los más grandes los de 'New Star'. Los valores de peso máximo se alcanzaron en un estado bastante avanzado del desarrollo del fruto, cuando las cerezas ya habían alcanzado su color rojo característico de fruto maduro para la recolección comercial, tal y como se ha encontrado en otras variedades de cereza (Díaz-Mula *et al.*, 2010).

En la cereza el proceso de maduración se caracteriza por los cambios de color de verde a rojo que pueden seguirse por la evolución de los parámetros de color L^* , a^* y b^* y por los índices de color Cromo y Hue. Además, el índice a^*/b^* se ha propuesto como un buen índice de color para diferentes variedades de cereza, puesto que presenta un continuo incremento durante la maduración del fruto en el árbol y se ha usado también en otros frutos como manzana, pera y melocotón (Díaz-Mula *et al.*, 2010). Los resultados reflejados en el capítulo 3 de esta Tesis muestran que este índice de color aumentó en todas las variedades estudiadas al avanzar el estado de maduración, encontrándose el valor más alto en la variedad 'Marvin' y el más bajo en 'New Star', lo que indica que estas variedades poseen el color rojo más oscuro y más claro, respectivamente. Además, teniendo en cuenta la relación entre el índice de color a^*/b^* y la concentración de antocianinas totales en cereza (Díaz-Mula *et al.*, 2010), se puede inferir que existen diferencias en la concentración de antocianinas entre estas variedades, lo que determinaría diferencias en su capacidad antioxidante y por tanto, en sus posibles efectos beneficiosos para la salud de los consumidores (Scalbert *et al.*, 2005; Díaz-Mula *et al.*, 2010; Serrano *et al.*, 2009).

El contenido en sólidos solubles totales también incrementó al avanzar el proceso de maduración en todas las variedades, oscilando estos valores en el estado más avanzado de maduración entre ≈ 12 °Brix en 'Burlat' y $\approx 20,5$ °Brix en las variedades 'Brooks' y 'Ruby'. En términos generales se puede decir que estas variedades tienen un elevado contenido en sólidos solubles, puesto que en otras variedades, recolectados en el estado de maduración comercial, se han encontrados valores entre 11 y 25 °Brix (Girard y Kopp, 1998; Esti *et al.*, 2002; Serrano *et al.*, 2005a y b). Los principales compuestos que contribuyen a los sólidos solubles son los azúcares, responsables del dulzor de este fruto y con un papel relevante el grado de aceptación de los consumidores. Los azúcares más abundantes en la cereza son glucosa y fructosa, seguidos de sorbitol y sacarosa (Girard y Kopp, 1998; Serrano *et al.*, 2005a; Usenik *et al.*, 2008).



También en el contenido en acidez total se encontraron diferencias significativas entre las distintas variedades estudiadas, encontrándose los valores más altos en el último estado de maduración en la variedad 'Somerset' seguido por 'New Star', mientras que en las demás variedades los valores en este estado de maduración fueron bastante más bajos. Es interesante resaltar que el contenido en acidez total aumentó durante el proceso de maduración de la cereza en el árbol, al igual que se ha encontrado en otras variedades de cereza, como 'Lapins' y '4-70', también denominada 'Marvin' en trabajos previos (Drake y Elfving, 2002; Serrano *et al.*, 2005a), mientras que en otros frutos de hueso, como nectarinas (Iglesias y Echevarría, 2009) y melocotones (Byrne *et al.*, 1991) la acidez total disminuye durante la maduración. No obstante, en estos frutos no es sólo el contenido en azúcares o en ácidos sino la relación entre ellos lo que se ha propuesto como determinante del grado de aceptación por los consumidores (Crisosto *et al.*, 2003). Esta relación incrementó a lo largo del proceso de maduración en todas las variedades, alcanzando los valores más altos las variedades 'Brooks', 'Marvin' y 'Ruby' y los más bajos 'New Star' y 'Somerset'.

Finalmente, la firmeza también es un atributo muy apreciado por los consumidores en la mayoría de los frutos carnosos, incluyendo la cereza, ya que se prefieren frutos firmes y crujientes al morder. En este estudio se encontró un descenso de la firmeza asociado al proceso de maduración, aunque los valores finales en el fruto maduro fueron diferentes dependiendo de la variedad, encontrándose los valores más bajos en 'Cristobalina' y los más elevados en 'Brooks'. Este proceso de ablandamiento en la cereza se ha atribuido fundamentalmente a un aumento en la actividad β -galactosidasa, mientras que en la mayor parte de los frutos carnosos las pérdidas de firmeza se deben a la despolimerización de las pectinas causada por la acción de la poligalacturonasa (Gerardi *et al.*, 2001; Batisse *et al.*, 1996).

Teniendo en cuenta los parámetros relacionados con la calidad organoléptica podría concluirse que las variedades más apropiados son 'Brooks' y 'Marvin', siendo esta última la que presentó los valores más elevados de color, y por tanto, la que tendría mayor contenido en compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes como son las antocianinas. Sin embargo, si se consideran los parámetros relacionados con la biología floral, los resultados más favorables respecto al número de yemas florales y al número de flores por ramillete de Mayo se obtuvieron en 'Brooks', 'Cristobalina', 'Marvin' y 'Ruby'. Además 'Cristobalina'



presentó un alto porcentaje de cuaje de frutos en todos los años de estudio, aunque el tamaño de la cereza y sus valores de firmeza fueron muy bajos. Como se ha indicado anteriormente, desde el punto de vista de las necesidades de frío para florecer, las variedades más apropiadas para ser cultivadas en amplias zonas de la Región de Murcia son aquellas con bajos requerimientos como 'Cristobalina' y 'Brooks' para evitar problemas productivos.





BIBLIOGRAFÍA GENERAL



- Agustí, M.** (2004) Fruticultura. Ed. Mundi-Prensa. Madrid-Barcelona-México. pp. 493.
- Albuquerque N., Burgos L. y Egea J.** (2003) Apricot flower bud development and abscission related to chilling, irrigation and type of shoots. *Scientia Horticulturae* **98**: 265-276.
- Albuquerque N., Burgos L. y Egea J.** (2004) Influence of flower bud density, flower bud drop and fruit set on apricot productivity. *Scientia Horticulturae* **102**: 397-406.
- Albuquerque N., Burgos L., Sedgley M. y Egea J.** (2004). Contributing to the knowledge of the fertilisation process in four apricot cultivars *Scientia Horticulturae* **102**: 387-396
- Albuquerque, N., Egea, J., Pérez-Tornero, O. y Burgos, L.** (2002). Genotyping apricot cultivars for self-(in)compatibility by means of RNases associated with S alleles. *Plant Breeding* **121**: 343-347
- Aliaga, J.R., Casanova, R. y Torres, V.** (1992) Las temperaturas invernales y la floración en las cultivadas en zonas cálidas. II *Jornadas sobre Experimentación en Fruticultura. SECH. Moncada (Valencia)*. pp: 11.
- Alonso, J.M., Ansón, J.M., Espiau, M.T., Socias i Company, R.** (2005). Determination of endodormancy break in almond flower buds by a correlation model using the average temperature of different day intervals and its application to the estimation of chill and heat requirements and blooming date. *Journal of American Society for Horticultural Science* **130**: 308-318.
- Amenduni, T., Trisciuzzi, N., Bazzioni, A., Myrta, A., Murolo, O., Terlizi, B. y Savino, V.** (2001). Nuove acquisizioni sullo statu sanitario del ciliegio in Puglia. *Revista di frutticoltura e di Ortofloricoltura* **63**: 12-16.
- Atkinson, C.J. y Lucas, A.S.** (1996). The response of flowering date and cropping of *Pyrus communis* cv Concorde to autumn warming. *Journal of Horticultural Science* **71**: 427-434.



- Atkinson, C.J. y Taylor, L.** (1994). The influence of autumn temperatura on flowering time and cropping of *Prunus communis* cv. *Conference*. *Journal of Horticultural Science* **69**: 1067-1075.
- Baggiolini, M.** (1952). Stade repères du pecher. *Revue Romande d'Agriculture, Viticulture et Arboriculture* **4**: 29.
- Ballester-Segarra, A.** (1992). El cultivo del cerezo en la Comunidad Valenciana. *Fruticultura Profesional* **50**: 5-18.
- Barberan, F. A. y Espín, J. C.** (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of Science and Food Agricultural* **81**: 853-876.
- Bargioni, G.** (1980) La pollinisation du cerisier. *Symposium Internacional "La cultura du cerisier"*. Gembloux. pp: 178-190.
- Bargioni, G. y Cossio, F.** (1980). Contributo allo studio della biologia fiorale del ciliegio. *Atti del seminario sulla fertilita della piante da frutto*. Bologna 477-489.
- Barret, D.M. y González, C.** (1994). Activity of softening enzymes during cherry maturation. *Journal and Food Science* **59**: 574-577.
- Baskerville, G. L. y Emin, P.** (1969). Rapad estimation of heat accumulation from maximum and minimum temperaturas. *Ecology* **50**: 514-517.
- Batisse, C., Buret, M. y Coulomb, P.J.** (1996). Biochemical differences in cell wall of cherry fruit between soft and crisp fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**: 453-457.
- Bellini, E. y Gianelli, G.** (1975). Sul valore taxonómico di alcuni caratteri del ramo nel pesco. *Rivista Ortoflorofrutticultura. It.* **59 (6)**: 440-458.
- Beppu, K., Okamoto, S., Sugiyama, A. y Kataoka, I.** (1997). Effects of temperature on flower development and fruit set of *Satohnishiki* sweet cherry. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **65 (4)**: 702-712.
- Beppu, K., Ikeda, T. y Kataoka, I.** (2001). Effect of high temperature exposure time during flower bud formation on the occurrence of double pistils in 'Satohnishiki' sweet cherry. *Scientia Horticulturae*, **87**: 77-84.



- Bookman, S.S.** (1984). Evidence for selective fruit production in *Asclepias*. *Evolution* **38**: 72-86.
- Boskovic, R. y Tobutt, K. R.** (1996). Correlation of stylar ribonuclease zymograms with incompatibility alleles in sweet cherry. *Euphitica* **90**: 245-250.
- Boskovic, R. y Tobutt, K. R.** (2001). Genotyping cherry cultivars assigned to incompatibility groups, by analysing stylar ribonucleases. *Theoretical and Applied Genetics* **103**: 475-485.
- Boskovic, R., Russell, K., y Tobutt, K. R.** (1997). Inheritance of stylar ribonucleases in cherry progenies, and reassignment of incompatibility alleles to two incompatibility groups. *Euphitica* **95**: 221-228.
- Brown S. K., Iezzoni, A. F., Fogle H. W.** (1996) Cherries: En: Fruit Breeding. Vol. I. Tree and tropical fruits. Editores: Janick J., Moore J. M. Purdue Univ. Press. W. Lafayette, IN., USA: 213-255.
- Byrne, D. H., Sherman, W. B., Bacon, T. A.** (2003). Stone fruit genetic pool and its exploitation for growing under warm climatic conditions. En: Temperate Fruit Crops in Warm Climates. Editor: Erez, A. Kluwer Academic Publishers. Holanda. 157-230.
- Byrne D.H., Nikolic A.N., Burns E.E.** (1991). Variability in sugars, acids, firmness and colour characteristics of 12 peach genotypes. *Journal of American Society for Horticultural Science* **116**: 1004-1006.
- Burgos, L., Egea, J., Guerriero, R., Viti, R., Monteleone, P. y Audergon, J. M.**(1997). The self-compatibility trait of the main apricot cultivars and new selections from breeding programmes. *Journal of Horticultural Science* **72**: 147-154.
- Burgos, L., Pérez-Tornero, O., Ballester, J. y Olmos, E.** (1998). Detection and inheritance of stylar ribonucleases associated with incompatibility alleles in apricot. *Sexual Plant Reproduction* **11**: 153-158.



- Buttrose, M. S. y Sedgley, M.** (1979). Anatomy of watermelon embryo sacs following pollination, non-pollination or parthenocarpic induction of fruit development. *Annals of Botany* **43**: 141-146.
- Caprio J.M. y Quamme H.A.** (1998). Weather conditions associated with apple production in the Okanagan Valley of British Columbia. *Canadian Journal of Plant Science* 129-137.
- Caprio J.M. y Quamme H.A.** (2006). Influence of weather on apricot, peach and sweet cherry production in the Okanagan Valley of British Columbia. *Can. J. Plant Sci.* **86**: 259-267.
- Certal, A.C., Almeida, R.B., Boskovic, R., Oliveira, M.M. y Feijó, J.A.** (2002). Structural and molecular analysis of self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). *Sexual Plant Reproduction* **15**: 13-20.
- Chaovanalikit, A. y Wrolstad, R. E.** (2004). Total anthocyanin and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *Journal and Food Science* **69**: FCT67-FCT72.
- Chistesén, J. V.** (1995). Evaluation of fruit characteristics of 20 sweet cherry cultivars. *Fruit Varieties Journal* **49**: 113-117.
- Choi, C., Tao, R. Andersen, R. L.** (2002). Identification of self-incompatibility alleles and pollen incompatibility groups in sweet cherry by PCR based s-allele typing and controlled pollination. *Euphytica* **123**: 9-20.
- Choi C. y Andersen R.** (2001). Variable fruit set in self-fertile sweet cherry. *Canadian Journal of Plant Science* **81**: 753-760.
- Chu, C.L., Liu, W.T. y Zhou, T.** (2001). Fumigation of sweet cherries with thymol and acetic acid to reduce postharvest brown rot and blue mold rot. *Fruits* **56**: 123-130.
- Clanet, H. y Salles, J. C.** (1972). L'éclaircissage des fleurs ou des jeunes fruits du pêcher. (Thinning of flowers or young fruits of the peach tree). *La Pomologie Française* **14**: 219-224.
- Clarke, A.E. y Newbigin, E.d.** (1993). Molecular aspects of self-incompatibility in flowering plants. *Annual Review Genetic* **27**: 257-279.



- Cline J.A., Meland M., Sekse L. y Webster A.D.** (1995). Rain cracking of sweet cherries: 2. Influence of rain covers and rootstocks on cracking and fruit quality. *Acta Agriculturae Scandinavica* **45**: 224-230.
- Citadin, I., Raseira, M.C.B., Herter, F.G., Baptista da Silva, J.** (2001). Heat requirement for blooming and leafing in peach. *HortScience* **36**: 305-307.
- Couvillon, G. A.** (1995). Temperature and stress effects on rest in fruit trees: A review dormancy and the related problems of deciduous fruit trees **395**: 11-19.
- Couvillon, G. A. y Erez, A.** (1985). The influence of prolonged exposure to chilling temperatures on budbreak and heat requirement for bloom of several fruit species. *Journal of American Society for Horticultural Science* **110**: 47-50.
- Crane, M.B. y Brown, A.G.** (1937). Incompatibility and sterility in the sweet cherry (*Prunus avium* L.) *Journal of Pomology* **15**: 86-116.
- Crisosto, C. H.** (1994). Stone fruit indices: a descriptive review. *Postharvest News Information* **5**: 65N-68N.
- Crisosto, C.H., Crisosto, G.M. y Metheney, P.** (2003). Consumer acceptance of "Brooks" and "Bing" cherries is mainly dependent on fruit SSC and visual skin color. *Postharvest Biology and Technology* **28**: 159-167.
- Crisosto, C.H., Crisosto, G.M. y Ritenour, M.** (2002). Testing the reliability of skin color as an indicator of quality for early season "Brooks" (*Prunus avium* L.) cherry. *Postharvest Biology and Technology* **24**: 147-154.
- Cummis, J. N., Wilcox, W. F. y Forsline, P. L.** (1986). Tolerance of some new cherry rootstocks to December freezing and *Phytophthora* root rots. *Compact fruit tree*, Vol. **19**: 90-96.
- Daubeny, H. A., Crandall, P. C. y Eaton, G. W.** (1967). Crumbliness in the red raspberry with special reference to the *Sumner* variety. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **91**: 224-230.
- Díaz-Mula, H. M., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valero, D., Zapara, P. J., Guillen, F. y Serrano, M.** (2009). Organoleptic, nutritive and functional



- properties of sweet cherry as affected by cultivar and reopening stage. *Food Science and Technology International* **15**: 535-544.
- Dicenta F y García J. E.** (1993) Inheritance of self-compatibility in almond. *Heredity* **70**: 313-317.
- Dickinson, H.G.** (1995) Dry stigmas, water and self-incompatibility in *Brassica*. *Sexual Plant Reproduction* **8**: 1-10.
- Drake, S.R. y Elfving, D.C.** (2002) Indicators of maturity and storage quality of "Lapins" sweet cherry. *HortTechnology* **12**: 687-690.
- Droby, S., Cohen, L., Daus, A., Weiss, B., Horev, B., Chalutz, H., Keren-Tzur, M. y Shachnai, A.** (1998) Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of fruits. *Biol. Contr.* **12**: 97-101.
- Dominguez, A.** (1984). Tratado de fertilización. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. pp 587.
- Eaton G.W.** (1959). A study of megagametophyte in *Prunus avium* and its relation to fruit setting. *Canadian Journal of Plant Science* **39**: 466-476.
- Eaton G.W.** (1962) Further studies on sweet cherry embryo sac in relation to fruit setting. *Reports of Ontario Horticultural Experimental Station*, 26-38.
- Egea J, Burgos L, Zoroa N and Egea L.** (1992). Influence of temperature on the *in vitro* germination of pollen of apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal Horticultural Science* **67**: 247-250.
- Egea, J., Ortega, E., Martinez-Gomez, P., Dicenta, F.** (2003). Chilling and heat requirements of almond cultivars for flowering. *Environ. Exp. Bot.* **50**: 79-85.
- Entani, T; Iwano, M; Shiba, H; Che, FS; Isogai, A; Takayama, S.** (2003). Comparative analysis of the self-incompatibility (S-) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity. *Genes to Cells* **8**:203-213.
- Erez, A.** (1995). Means to compensate for insufficient chilling to improve bloom and leafing. *Acta Horticulturae* **395**: 81-95.



- Erez, A. (2000). Bud dormancy; phenomenom, problems and solutions in the tropics and subtropics. En: Erez, A. (Ed.), *Temperature Fruit Crops in Warm Climates*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda, pp. 28-29.
- Erez, A., Couvillon, G. A. y Hendershott, C. H. (1979a). The effect of cycle length on chilling negation by high temperatures in dormant peach leaf buds. *Journal of Amarican Society and Horticultural Science* **104**: 573-576.
- Erez, A., Couvillon, G. A. y Hendershott, C. H. (1979b). Quantitative chilling enhancement and negation in peach buds by high temperatures in a daily cycle. *Journal of American Society and Horticultural Science* **104**: 536-540.
- Erez, A. y Couvillon, G. A. (1987). Characterization of the influence of moderate temperaturas on rest completion in peach. *Journal of American Society and Horticultural Science* **112**: 677-680.
- Erez, A. y Couvillon, G. A. (1988). Evaluation of winter climate for breaking bud rest usin the dynamic model. *Acta Horticulturae* **232**: 76-78.
- Erez, A. y Lavée, S. (1971). The effect of climatic conditions on dormancy development of peach buds. I. *Temperature*. *Journal of American Society and Horticultural Science* **96**: 711-714.
- Estadística Regional (2007). <http://caamext.carm.es:8080/esamweb/>
- Esti, M., Cinquante, L., Sinesio, F., Moneta, E. y Di Matteo, M. (2002). Physicochemical and sensory fruit characteristic of two sweet cherry cultivars after cool storage. *Food Chemistry* **76**: 399-405.
- FAOSTAT (2007). Statistical Database. <http://www.fao.org/corp/>
- Faust, M. (1989). *Physiology of temperate zone fruit trees*. Editorial Wiley. New York. pp 338.
- Fennell, A. (1999). Systems and approaches to studying dormancy: Introduction to the workshop. *HortScience* **34**: 1172-1173.
- Fleckinger J. (1955). Phenologie et aboriculture fruitière. *Bon Jardinier* **1**: 362-372.



- Flore, J.A., Fernandez, T.R.** (1995). Intermittent spray of CaCl₂ to inhibit cracking of Sweet Cherry. *International Conference on Cherry Cracking. Traverse City, Michigan, USA.*
- Fogle H.W.** (1975). Cherries. En: *Advances in fruit breeding*. Editores: Janick J., Moore J.N. Ed. Purdue Univ. Press. W. Lafayette, IN., USA. pp. 348-366.
- Frediani, D. y Pinzauti, M.** (1981). L'appe mellifera nell'impollinazione di alcune cultivar di ciliegio dolce. *Revista di Frutticoltura* **34**: 31-36.
- Frutos, D.** (1995). El cerezo, cultivo alternativo. Avances de resultados del CIDA. *Jornadas de frutales de hueso en Murcia*. Ed. Fundación La Caixa. Barcelona. ISBN: 84-7664-501-5. pp:109-120.
- Frutos, D., García, F. y Carrillo, A.** (2008). VI Jornada Técnica sobre el cerezo en la Región de Murcia. IMIDA. *Consejería de Agricultura y Agua. Murcia, Abr. 2008*. pp: 36. (http://www.imida.es/VIII_J_Cerezo.html).
- Gao, L. y Mazza, G.** (1995). Characterization, quantification, and distribution of anthocyanins and colorless phenolic in sweet cherries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**: 343-346.
- García, F., Costa, J. y Ferragut, F.** (1994). Las plagas agrícolas. *Edita Agropubli, S. L. (Phytoma-España)*. ISBN: 84- 605-0857-9.
- Gerardi, C., Blando, F., Santino, A. y Zacheo, G.** (2001). Purification and characterisation of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *Plant Science* **160**: 795-805.
- Gil, G.** (1997). El potencial productivo. *Ediciones Universidad Católica de Chile*. Santiago de Chile. pp 583.
- Gil-Albert, F.** (1989a). Tratado de arboricultura frutal. Vol.I: Aspectos de la morfología y fisiología del árbol frutal. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. pp: 103.
- Gil-Albert, F.** (1989b). Tratado de arboricultura frutal. Vol. II: La ecología del árbol frutal. 2ª Ed. Mundi-Prensa. Madrid. pp: 236.



- Gilreath, P. R. y Buchanan, D. W.** (1981). Rest prediction model for low chilling "Songolds" nectarine. *Journal of American Society and Horticultural Science* **106**: 426-429.
- Girard, B. y Kopp, T. G.** (1998). Physicochemical characteristics of selected sweet cherry cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 471-476.
- Gisbert, A. d., Romero, C., Llacer, G. y Badenes, M. L.** (2006). Identificación de alelos S en una población de variedades autóctonas de cerezo de la "Montaña de Alicante". *Boletín informativo SECH. Vol. 19*: 4-6.
- Giulivo C. y Ramina A.** (1974). Effeto di massa ed azione del calcio sulla germinazione del polline di alcune specie arboree da frutto. *Rivista Ortoflorofrutticoltura Italiana* **58**: 3-13.
- Gonçalves, B., Landbo, A. K., Knudse, D., Silva, A. P., Moutinho-Pereira, J, Rosa, E. Y Meyer, A. S.** (2004) Effect of ripeness and postharvest storage on the phenolic profiles of cherries (*Prunus avium* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 523-530.
- Gonçalves, B., Moutinho-Pereira, J., Santos, A., Silva, A. P., Barcelar, E., Correira, C. y Rosa, E.** (2006). Scion-rootstock interaction affects the physiology and fruit quality of sweet cherry. *Tree Physiology* **26**: 93-104.
- Griggs, W. H., Vansell, H. y Iwakiri, b. T.** (1953). The storage of hand-collected and bee-collected pollen in a home freezer. *Proceeding of the American Society for Horticultural science* **62**: 304-305-
- Guitian, J.** (1993). Why *Prunus mahaleb* (Rosaceae) produces more flowers than fruits. *American Journal of Botany* **80**: 1305-1309.
- Harms, M., Buttner, C., Graf, H. y Schickedanz, F.** (1996). Untersuchungen zur Ausbreitung der virosen Kleinfruchtigkeit der Susskirsche (*little cherry disease*) in norddeutschen Erwerbsobstanlagen. *Erberbsobstbau*, **38**: **1**, 2-7.
- Hauck, N. R., Iezzoni, A. F., Yamane, H., y Tao, R.** (2001). Revisiting the S-allele nomenclature in sweet cherry (*Prunus avium*) using RFLP profiles. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **126**: 654-660.



- Hedhly, A., Hormaza, J. I. y Herrero, M. (2003). The effect of temperatura on stigmatic receptivity in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant, Cell and Environment* **26**: 1673-1680.
- Hedhly, A., Hormaza, J. I. y Herrero, M. (2004). Effect of temperature on pollen tube kinetics and dynamics in sweet cherry, *Prunus avium* L. (Rosaceae). *American Journal of Botany* **91**: 558-564.
- Hedhly, A., Hormaza, J. I. y Herrero, M. (2005). Influence of genotype-temperature interation on pollen performance. *Journal Evolutionary Biology* **18**: 1494-1502.
- Hedhly, A., Hormaza, J. I. y Herrero, M. (2007). Warm temperaturas at bloom reduce fruit set in sweet cherry. *Journal of Applied Botany and Food Quality* **81**: 158-164.
- Herraiz, V. (1992). El cultivo del cerezo en la Comarca de la Almunia. *Fruticultura Profesional* **49**: 31-42.
- Heslop-Harrison, J. (1975). Incompatibility and the pollen-stigma interaction. *Annual review of Plant Physiology* **26**: 403-425.
- Heslop-Harrison, Y. (2000). Control gates and micro-ecology: the pollen-stigma interaction in perspective. *Annals of Botany* **85**: 5-13.
- Hormaza, J.I. y Herrero, M. (1999). Pollen performance as affected by pistilar genotype in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Protoplasma* **208**: 129-135
- Iezzoni A.F. y Mulinix C.A. (1992) Yield components among sour cherry seedlings. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **117**: 380-383.
- Iglesias, I. (1991). El cultivo del cerezo: Situación y perspectivas de futuro en la CEE-12, España y Cataluña. *Fruticultura profesional* **42**: 37-52.
- Iglesias I., Echeverria G., (2009). Differential effect of cultivar and harvest date on nectarine colour, quality and consumer acceptance. *Science Horticulturae -Amsterdam* **102** : 41-50.



- Jackson J.E. y Hamer P.J.C.** (1980). The causes of year-to-year variation in the average yield of 'Cox's Orange Pippin' apple in England. *Journal of Horticultural Science* **55**: 149-156.
- Juhasz, L., Paldi, E., Brunner, T., Hampson, C.R. (ed.), Anderson, R.L. (ed.), Perry, R.L. (ed.) y Webster, A.D.** (1996). The relationship among fruiting, vegetative growth and rootstock in sweet cherry trees. *Acta Horticulturae* **410**: 291-294.
- Jürgens, G.** (1990). Qualität durch Blattdünger bet Kirchen. *Erwerbsobstbau*. **32**: 147-149.
- Kaur, C. y Kapoor, H. C.** (2001). Antioxidants in fruit and vegetables- The millennium health. *International Journal of Food Science and Technology* **36**: 703-725.
- Khadari B., Gibernau M., Anstett M.C., Kjellberg F. y Hossaert- cKey M.** (1995). When fig wait for pollinators: the length of fig receptivity. *American Journal of Botany* **82**: 992-999.
- Kim, D. O., Heo, h. J., Kim, Y. J., Yang, H. S. y Lee, C. Y.** (2005). Sweet and sour cherry and their protective effects on neuronal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 9921-9927.
- Kison, H. y Seemuler, E.** (2001). Differences in strain virulence of the European stone fruit yellow phytoplasma and susceptibility of stone fruit trees on various rootstocks to this pathogen. *Journal of Phytopathology* **149**: 533-541.
- Kolesnikova, A. F.** (1975). Breeding and some biological characteristics of sour cherry in central Russia. *Orel, Russia: Prikstoc izdatel'stvo*.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, k. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Grielg, A. E. y Etherton, T. D.** (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine* **113**: 71-88.
- Krzesinska, E. Z. y Arazenko, A. N. M.** (1992). Excised twig assay to evaluate Cherry rootstocks for tolerante to *Pseudomonas syringae* p.v. *Syringae*. *HortScience* **27**: 153-155.



- Kwack B.H.** (1965). The effect of calcium on pollen germination. *Proceeding American Society for Horticultural Science* **86**: 818-823.
- Lai, Z; Ma, WS; Han, B, Liang LZ, Zhang YS, Hong GF y Xue YB.** (2002). An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Molecular Biology* **50**: 29-42.
- Lavee, S.** (1973). Dormancy and bud break in warm climates: Considerations of growth-regulator involvement. *Acta Horticulturae* **34**: 225-234.
- Legave, J. M.** (1975). La differenciation du bourgeron a fleur et le repos hivernal chez l'abricotier (*Prunus armeniaca vulgaris*). *La Pomologie Francaise* **17**: 150-168.
- Legave, J.M.** (1978). Essai d'interprétation de neécroses florales avant la floraison chez l'abricotier en relation avec une étude des besoins en froid des bourgeons pour la levée de dormance. *Annales de l'Amelioration des Plantes* **28**: 593-607.
- Legave, J.M., García, G. y Marco, F.** (1982). Some descriptive aspects of drops process of flower buds, or young flowers observe don apricot tree in south of France. *Acta Horticulturae* **121**: 75-83.
- Lichou, J., Edin, M., Tornel, C. y Saunier, R.** (1990). Le cerisier: la cerise du table. París. *Ed. Ctifl*. pp: 35-70.
- Lichou, J.F, Edin, M., Saunier, R., et al.** (1997). Cerise. Les variétés et leur conduite. París. *Ctifl*. pp: 12-27.
- Lichou, J.F., Jay, M., Lafouge, M.** (1989). Intensification des systèmes de vergers. *Special cerise. L'Arboriculture Fruitiere* **416**: 56-61.
- Long, L.E.** (1997). Spanish Bush increases worker productivity. *Good Fruit Grower*. **48**: 27-33; 14 col. pl.
- Lora, J., Pérez de Oteyza, M. A., Fuentetaja P. y Hormaza J. I.** (2006). Low temperature storage and in vitro germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) pollen. *Scientia Horticulturae* **108**: 91-94.



- Mahmood, K., Carew, J. G., Hadley, P. y Battley, H.** (2000). The effect of chilling and post-chilling temperatures on growth and flowering of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **75**: 598-601.
- MAPYA** (2007). Estadística Agraria Nacional. Página Web: www.mapa.es/es/estadistica/infoestad.html.
- Marro, M.** (1976). Ricerche sulla evoluzione del sacco embrionaie del melo *Richard* nel corso della fioritura. *Revista Ortoflorofrutticoltura Italian*, **60**: 185-198.
- Marsall, J.** (1990). Plantaciones intensivas o semi-intensivas de cerezo. *Fruticultura Profesional* **30**: 55-60.
- Martínez-Gómez, P., Gradziel, T.M., Ortega, E.y Dicenta, F.** (2000). Short-term storage of almond pollen. *HortScience* **35**: 1151-1152.
- Martínez-Gómez, P., Gradziel, T.M., Ortega, E.y Dicenta, F.** (2002). Low temperature storage of almond pollen. *HortScience* **37**: 691-692.
- Mattheis, J.P., Buchanan, D.A. y Fellman, J.K.** (1997). Volatile constituents of Bing sweet cherry fruit following controlled atmosphere storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**: 212-216.
- Mau, S.L., Raff, J. y Clarke, A.E.** (1982). Isolation and partial characterization of components of *Prunus avium* L. styles, including an antigenic glycoprotein associated with a self-incompatibility genotype. *Planta* **156**: 505-516.
- Mayer, D., Rathbone, L. y Miliczky, E. M.** (1988). New ideas in cherry pollinatio. *Proceding of Anual Meeting. Wash. St. Hort. Ass.* 228-229.
- Meier, U., Graf H., Hack H., Hess M., Kennel W., Klose R., Mappes D., Seipp D., Stauss R., Streif J., Van den Boom T.** (1994). Phänologische Entwicklungsstadien des Kernobstes (*Malus domestica* Borkh. und *Pyrus communis* L.), des Steinobstes (Prunus-Arten), der Johannisbeere (Ribes-Arten) und der Erdbeere (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **46**: 141-153.



- Mckee, J. y Richards, A. J.** (1998). The effect of temperature on reproduction in five *Primula* species. *Annals of Botany* **82**: 359-374.
- McClure BA, Haring V, Ebert PR, Anderson MA, Simpson RJ, Sakiyama F y Clarke AE.** (1989). Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* **342**: 955-957.
- McClure BA y Franklin-Tong V.** (2006). Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in "self" pollen tube inhibition. *Planta* **224**: 233-245.
- Melgarejo, P.** (1996). El frío invernal, factor limitante para el cultivo frutal: Modelos y métodos para determinar la acumulación de frío y de calor en frutales. *Ed. A. Madrid Vicente. Madrid*, pp:166.
- Moreno, M. A.** (1991). El patrón ciruelo Adara: su comportamiento con variedades de cerezo y de otras especies frutales. *ITEA* **87**: 25-35.
- Moreno, M. A., Montanés, L., Tabuena, M. C. y Cambra, R.** (1996). The performance of Adara as a cherry rootstock. *Scientia Horticulturae* **65**:18.
- Movileanu, M., Onofrei, P. y Lacobuta, G.** (1989). The performance of some cherry cultivars in the Moldavia. *Cercetari Agronomice in Moldavia* **22**: 61-66.
- Mozetiç, B., Trebše, P., Simçiç, M. y Hribar, J.** (2004). Changes of anthocyanins and hydroxycinnamic acids affecting the skin colour during maturation of sweet cherries (*Prunus avium* L.). *Lebensm. Wiss. Technol.* **37**: 123-128.
- Mozetiç, B., Simçiç, M., y Trebše, P.,** (2006). Anthocyanins and hydroxycinnamic acids of Lambert Compact cherries (*Prunus avium* L.) after cold storage and 1- methylcyclopropene treatments. *Food Chemistry* **97**: 302-309.
- Muskovics, G., Felföldi, J., Kovács, E., Perlaki, R. y Kállay, T.** (2006). Changes in physical properties during fruit ripening of Hungarian sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Postharvest Biology and Technology* **40**: 56-63.
- Nicolas, J. y Bonnet, E.** (1993).- Advance de maturité avec la cyanamide hydrogene, trois annees d'essai. *L'Arboriculture. Fruitiere* **458**: 17-20.



- Nikkanen, T., Aronen, T., Haggman, H. y Vena la Inen, M.** (2000). Variation in pollen viability among *Picea abies* genotypes - Potential for unequal paternal success. *Theoretical and Applied Genetics* **101**: 511-518.
- Ogawa, J., Zehr, E., Bird, G., Ritche, D., Uriu, K. y Uyemoto, J.** (2000). Plagas y enfermedades de los frutales de hueso. *Edita Mundi-Prensa*. Madrid. pp. 97.
- Okie W.R. y Werner D.J.** (1996). Genetic influence on flower bud density in peach and nectarine exceeds that of environment. *HortScience* **31**: 1010-1012.
- Ou, S.K., Chen C.L.** (2000). Estimation of the chilling requirement and development of a low-chill model for local peach trees in Taiwan. *Journal of Chinese Society for Horticultural Science* **46**: 337-350.
- Petre, L.** (1987). Effect of frost in the 1984-1985 winter on sweet and sour cherries in north-east Moldavia. *Cercetari Agronomice in Moldavia* **20**: 107-112.
- Pfahler, P.L., Pereira, M.J. y Barnett, R.D.** (1997). Genetic variation of in vitro sesame pollen germination and tube growth. *Theoretical and Applied Genetics* **95**: 1218-1222.
- Pfeilstetter, E., Kunz, L. y Zinkernagel, V.** (1996). Viral twig necrosis of sweet cherry. Modes of transmission and spread of *Petunia Asteroid Mosaic Virus* (PeAMV). *Annals of Applied Biology*, **128**: 285-301.
- Pommier, P. y Dupre, P.** (1988). Recherche sur les phenomenes physiologiques et biochrrniques lies au rnetabolisrne energetique et de la maturation, sur l'eclatement de la cerise. *Septieme colloque sur les recherches frutières*. CTIFL-INRA: 97-110.
- Postweiler, K., Stösser, R. y Anvari, S.F.** (1985). The effect of different temperatures on the viability of ovules in cherries. *Sci Hortic -Amsterdam* **25**: 235-239.
- Predieri, S., Dris, R. y Rapparini, F.** (2004). Influence of growing conditions on yield and quality of cherry: II. Fruit quality. *Food, Agric. and Env.* **2**: 307-309.
- Qin, G., Tian, S. y Xu, Y.** (2004). Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeast in different storage conditions. *Postharvest Biology and Technology* **31**: 51-58.



- Richardson, E.A., Seeley, S.D. y Walker, D.R.** (1974). A model for estimating the completion of rest for 'Redhaven' and 'Elberta' peach trees. *HortScience*, **1**: 236-237.
- Richardson, E.A., Seeley, S.D., Walker, D.R., Anderson, J.L. y Ashcroft, G.L.** (1975). Pheno-climatography of spring peach bud development. *HortScience* **10**: 331-332.
- Romano, G. S., Cittadini, E. D., Pugh, B. y Schouten, R.** (2006). Sweet cherry quality in the horticultural production chain. *Stewart Postharvest Review* **6**: 1-7.
- Romero, C., Vilanova, S., Burgos, L., Martínez-Calvo, J., Vicente, M., Llácer, G. y Badenes, M.L.** (2004). Analysis of the S-locus structure in *Prunus armeniaca* L. Identification of S-haplotype specific S-RNase and F-box genes. *Plant Mol Biology* **56**: 145-157.
- Roversi, A. y Ughini, V.** (1985) Ricerche sulla biología florale du ciliegio dolce. *Congrès Expofrut di Cesena*.
- Roversi, A. y Ughini, V.** (1989). Sensibilita delle gemme a fore del ciliegio ai geli invernali. *Ann. Fcult. di Agraria, Milan* **29**: 43-53.
- Roversi, A. Ughini, V. y Cossio, F.** (1993). Sensibilita delle gemme a fiore ai geli invernali. Indrizzi nei Miglior. Genetica e nella coltura dei ciliegio. *Atti die convegno. Verona, 21-23 giugno* **6**: 139-147.
- Roversi, A., Fajt, N., Monteforte, A., Folini, L. y Panelli, D.** (2008). Observations on the Occurrence of Sweet Cherry Double-Fruits in Italy and Slovenia. *Acta Horticulturae* **795**: 849-854.
- Ruíz, D. y Egea, J.** (2008). Analysis of the variability and correlations of floral biology factors affecting fruit set in apricot in a Mediterranean climate. *Scientia Horticulturae* **115**: 154-163.
- Sage, T.L., Bertin, R.I. y Williams, E.G.** (1994). Ovarian and other late-acting self-incompatibility systems. En: Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants. Editores Williams EG, Clarke AE y Knox RB. Dordrecht: Kluwer: 116-140.



- Sanzol, J. y Herrero, M.** (2001). The effective pollination period in fruit trees. *Scientia Horticulturae* **90**: 1-17.
- Sari-Gorla, M., Ottaviano, E. y Faini, D.** (1975). Genetic variability of gametophyte growth rate in maize. *Theoretical and Applied Genetics* **46**: 289-294.
- Sassa, H., Hirano, H. y Ikehashi, H.** (1992). Self-incompatibility related Rnases instyles of Japanese pear (*Pyrus serotonina* Rehd.). *Plant Cell Physiology* **33**: 811-814.
- Saunier, R.** (1970). Modification du comportement de deux cultivars de pêches par élimination d'une virose du type ringspot. Mémoire présenté our l'obtention du titre d'Ingenieur DPF Spécialité Agriculture.
- Saunier R.** (1978). Varietal susceptibility to frosts in cherry, plum, peach and nectarine trees]. *Institut National de Vulgarisation pour les Fruits, Legumes et Champignons*, 75 - Paris (France). [Frost control. Report of National Meeting [France]]. Lutte contre le gel. Compte-rendu des Journees Nationales. 75 - Paris (France). INVUFLEC. 69-84.
- Saunier, R., Fos, F. y Tanzin, Y.** (1989b). Special cerise : Améloration variétale. *Rev. L'Arboriculture Fruitière* **416**: 37-39.
- Saunier, R., Fos, F., Tanzin, Y., Edin, M. y Tornel, C.** (1989a). Special ceriser: les nouvelles variétés. *Rev. L'Arboriculture Fruitière* **416**: 40-47.
- Savino, V., Catalano, L., Terlizzi, B., Digiario, M., Murolo, O., Barba, M. y Hadidi, A.** (1995). The sanitary status of stone fruit species in Abulia. *Acta Horticulturae* **386**, 169-175.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. y Jiménez, L.** (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Review Food Science and Nutrition* **45**: 287-306.
- Schereiner, M. y Huyskens-Keil, S.** (2006). Phytochemicals in fruit and vegetables: health promotion and postharvest elicitors. *Critical Review in Plant Science* **25**: 267-278.



- Schick, J.L. y Toivonen, P.M.A. (2002). Reflective tarps at harvest reduce stem browning and improve fruit quality of cherries during subsequent storage. *Postharvest Biology and Technology* **25**: 117-121.
- Scorza, R. y Okie, W. R. (1990). Peaches (*Prunus persica* L. Batsch). *Acta Horticulturae* **290**: 177-231.
- Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S. y Valero, D. (2005a). Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 2741-2745.
- Serrano, M., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Guillén, F. y Valero, D. (2005b). The use of natural antifungal compounds improves the beneficial effects of MAP in sweet cherry storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **6**: 115-123.
- Serrano, M., Díaz-Mula, H. M., Zapata, P. J., Castillo, S., Guillen, F., Martínez-Romero, D., Valverde, M. J. y Valero, D. (2009). Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 3240-3246.
- Shaltout, A. D. Y Unrath, C. R. (1983). Rest completion prediction model for "Starkinson Delicious" apples. *Journal of American Society for Horticultural Science* **108**: 957-961.
- Sijacic P, Wang X, Skirpan AL, Wang Y, Dowd PE, McCubbin AG, Huang S, Kao T. H. (2004). Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* **429**: 302-305.
- Soing, P. (1989). Méthodes et régimes d'arrosage sur un verger de cerisiers. *París. Infos - Ctifl.* **54**: 2732.
- Sonneveld, T., Robbins, T. P., Boskovic, R. y Tobutt, K. R. (2001). Style-specific self-compatible mutation caused by deletion of the S-RNase gene in Japanese pear (*Pyrus serotina* Redh.). *Theoretical and Applied Genetics* **102**: 1046-1055.



- Sonneveld, T., Robbins, T. P., Boskovic, R. y Tobutt, K. R.** (2003). Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S₁ to S₁₆ using consensus and allele-specific primers. *Theoretical and Applied Genetics* **107**: 1059-1070.
- Sonneveld, T., Tobutt, K. R., Vaughan, S. P. y Robbins, T. P.** (2005). Loss of pollan S function in two self-compatible selections of *Prunus avium* is associated with deletion/mutation of an S haplotype-specific F-Box gene. *The Plant Cell* **17**: 37-51.
- Spiegel-Roy, P., Alston, F.H.** (1979). Chilling and post-dormant heat requirement as selection criteria for late-flowering pears. *Journal for Horticultural Science* **54**: 115-120.
- Stone, J.L., Thomson, J.D. & Dent-Acosta, S.J.** (1995). Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: a review. *American Journal of Botany* **82**: 1186-1197.
- Stösser, R. y Anvari S.F.** (1982). On the senescence of ovules in cherries. *Scientia Horticulturae* **16**: 29-38.
- Stösser, R. y Anvari S.F.** (1990). On the longevity of ovules in relation to fruit set in stone fruit. *Erwerbsobstbau* **32**: 134-137.
- Tabuenca, M.C.** (1983). Necesidades de frío invernal de variedades de cerezo. *An. Aula Dei* **16**: 661-667.
- Tao, R., Yamane, H., Sassa, H., Mori, H., Gradziel, T. M., Dandekar, A. M. y Sugiura, A.** (1997). Identification of stylar RNases associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). *Plant Cell Physiology* **38**: 304-311.
- Tao, R., Yamane, H., Sugiera, A., Murayana, H., Sassa, H. y Mori, H.** (1999). Molecular typing of S-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for S-RNases in sweet cherry. *Journal American Society for Horticultural Science* **124**: 224-233.



- Tao R, Habu T, Yamane H, Sugiura A and Iwamoto K.** (2000). Molecular markers for self-compatibility in Japanese apricot (*Prunus mume*). *HortScience* **36**: 1121-1123.
- Tersoglio, E., Naranjo, G., Rivero, L. y Quiroga, M.** (2006). Requerimiento de frío invernal y de calor en variedades de cerezos. *ITEA* **102**: 251-259.
- Tomás-Barberán, F. A. y Espín, J. C.** (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**: 853-876.
- Usenik, V., Fabčič, J. y Štampar, F.** (2008). Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry* **107**: 185-192.
- Usenik, V., Kastelec, D. y Štampar, F.** (2005). Physicochemical changes of sweet cherry fruits related to application of gibberellic acid. *Food Chemistry* **90**: 663-671.
- Ushijima, K., Sassa, H., Dandekar, A. M., Gradziel, T. M., Tao, R. e Hirano, H.** (2003). Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-Box gene with haplotype-specific polymorphism. *The Plant Cell* **15**: 771-781.
- Uyemoto, J. K., Kirkpatrick, B. C. y Cummings, J. N.** (1991). Susceptibility of selected cherry clones and related species to *Westworn X-disease*. *HortScience* **26**: 1510-1511.
- Uyemoto, J. K., Luhn, C. F., Griesbach, J. A. y Grant, J. A.** (1995). Occurrence and control of cherry stem pitting disease. *Plant Disease* **79**: 366-368.
- Valenzuela, L.** (1999). Manejo del huerto: Actualidad y perspectivas. Seminario "El negocio de las cerezas en Chile y en el mundo" pp. 1-19.
- Van Gastel, A. J. G.** (1976). Mutability of the self-incompatibility locus and identification of the S-bearing chromosome in *Nicotiana glauca*. Tesis doctoral. *Centre for Agricultural Publishing and Documentation*. Wageningen
- Vaughan, S. P., Russell, K., Sargent, D. J. y Tobutt, K. R.** (2006). Isolation of S-locus F-box alleles in *Prunus avium* and their application in a novel method



- to determinate self-incompatibility genotype. *Theoretical and Applied Genetics*, **112**: 856-866.
- Vavilov, N.I.** (1951). The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. (1 ed.) Anonymous Ronald Press Co., New York.
- Viti, R. y Monteleone, P.** (1991). Observations on flower bud growth in some low yield varieties of apricot. *Acta Horticulturae* **293**: 319-326.
- Viti, R. y Monteleone, P.** (1995). High temperature influence on the presence of flower bud anomalies in two apricot varieties characterized by different productivity. *Acta Horticulturae* **384**: 283-289.
- Wang, H., Cao, G. y Prior, R.L.** (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**: 304-309.
- Watkins, C.B.** (2000). Responses of horticultural commodities to high carbon dioxide as related to modified atmosphere packaging. *HortTechnology* **10**: 501-506.
- Watkins, R.** (1976). Cherry, plum, peach, apricot and almond. Evolution of crop plants. Edited by Simmonds N. W. Logman Press, New York: 242-247.
- Wiersma, P. A., Wu, Z., Zhou, L. y Hampson, C.** (2001). Identification of new self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.) and clarification of incompatibility groups by PCR and sequencing analysis. *Theoretical and Applied Genetics* **102**: 700-708.
- Wünsch, A. y Hormaza, J. I.** (2002). Identificación molecular de alelos de incompatibilidad polen-pistilo en variedades de cerezo (*Prunus avium* L.). *Actas de Horticultura* **34**: 717-722.
- Wünsch, A. y Hormaza, J. I.** (2004a). Cloning and characterization of genomic DNA sequences of four self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **108**: 299-305.
- Wünsch, A. y Hormaza, J. I.** (2004b). Molecular evaluation of genetic diversity and s-allele composition of local Spanish sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution* **51**: 635-641.



- Wünsch, A. y Hormaza, J. I.** (2004c). S-allele identification by PCR análisis in sweet cherry cultivars. *Plant Breeding* **123**: 1-6.
- Yamane, H., Tao, R., Murayama, H. y Sugiera, A.** (2000a). Determining the S-genotypes of several sweet cherry cultivars on PCR-RFLP análisis. *Journal Horticultural Science and Biotechnology* **75**: 526-567.
- Yamane, H., Tao, R., Murayama, H. y Sugiera, A.** (2000b). Determining S-genotypes of two sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars, *Takasogo* (Rockport Bigarreau) and *Hinode* (Early Purple). *Journal Horticultural Science and Biotechnology* **69**: 29-34.
- Zuzunaga, M., Serrano, M., Martínez-Romero, D., Valero, D. y Riquelme, F.** (2001). Comparative study of two plum (*Prunus salicina* Lindl) cultivars during growth and ripening. *Food Science and Technology International* **7**: 123-130.





CONCLUSIONES GENERALES



CONCLUSIONES GENERALES

Se han determinado las necesidades de frío y calor para florecer de siete variedades de cerezo dulce cultivadas en el noroeste de la Región de Murcia. Las necesidades de frío se calcularon por distintos métodos y no se observaron diferencias entre las determinadas mediante el modelo Utah o Richardson y el modelo Dinámico. Sin embargo, las necesidades estimadas como horas bajo 7 °C no se correlacionan con las estimadas mediante los modelos anteriores, lo que sugiere que este modelo no es el más adecuado para calcular las necesidades de frío del cerezo en las condiciones de clima Mediterráneo.

Los requerimientos de calor para florecer de las variedades de cerezo estudiadas son altos cuando comparamos con los obtenidos para otras especies del género *Prunus*.

Las necesidades de frío parecen tener una mayor influencia en la fecha de floración de las variedades de cerezo que las necesidades de calor en las condiciones climáticas en las que se han determinado. Así la fecha de floración media en los dos años de estudio fue más temprana en las variedades con menos necesidades de frío, aunque no mostraban menores necesidades de calor y las que florecieron más tarde tienen elevadas necesidades de frío y de calor.

El conocimiento de la relación entre la altitud y la acumulación de frío en diferentes áreas de una determinada región puede ser de gran ayuda a la hora de decidir qué variedades de cerezo dulce son las más adecuadas para cultivar. Las variedades objeto de este estudio muestran un amplio rango de necesidades de frío para romper el letargo. Hemos encontrado una correlación positiva entre la acumulación de frío y la altitud en diferentes zonas de la Región de Murcia. La probabilidad de satisfacer las necesidades de frío a diferentes altitudes se ha determinado a partir de información climática de varios años. 'Cristobalina', 'Brooks', 'Ruby', 'Burlat' y 'Somerset' se pueden cultivar en extensas áreas de la Región de Murcia con una alta probabilidad de satisfacer sus necesidades de frío invernal. Sin embargo, 'New Star' y particularmente 'Marvin' deberían cultivarse



sólo en las zonas más altas de la Región para evitar problemas relacionados con la falta de frío.

La capacidad de germinación del polen de todas las variedades estudiadas disminuyó después de 15 ó 30 días y se perdió completamente tras 60 días de conservación a 4 °C. Sin embargo, la viabilidad del polen de cerezo se puede mantener en porcentajes razonablemente elevados durante un año a -20 °C en todas las variedades. 'Cristobalina' mostró los porcentajes de germinación del polen mayores (por encima de 60%). Los valores alcanzados por el resto de las variedades oscilaron entre el 36% y el 44%.

Tanto el número de yemas de flor y número total de flores por ramillete, como el cuajado y el porcentaje de frutos dobles parecen ser caracteres muy dependientes del genotipo. Sin embargo, la densidad de yemas de flor determinada como número de yemas florales por longitud de rama no fue diferentes entre variedades, y tampoco se observaron diferencias en la caída de yemas de flor, aunque si una fuerte influencia del año.

Los parámetros de calidad de fruto estudiados diferían entre variedades y estados de madurez, siendo 'Marvin' y 'Brooks' las variedades con los valores más elevados en los parámetros relacionados con la calidad organoléptica.

Debido a que el interés de los mejoradores es diverso, el conocimiento de la biología floral, del comportamiento productivo o de la calidad de los frutos de las variedades estudiadas puede ayudar a escoger las más adecuadas para cultivar en condiciones de clima mediterráneo o para que sean utilizadas como parentales en futuros programas de mejora.



ANEXO I



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

Environmental and Experimental Botany 64 (2008) 162–170

**Environmental
and Experimental
Botany**

www.elsevier.com/locate/envexpbot

Chilling and heat requirements of sweet cherry cultivars and the relationship between altitude and the probability of satisfying the chill requirements

Nuria Alburquerque^{a,*}, Federico García-Montiel^b, Antonio Carrillo^c, Lorenzo Burgos^a

^a Dpto. Mejora de Frutales, CEBAS-CSIC, Murcia, Spain

^b CARM, Oficina Comarcal Agraria "Vega Alta", Cieza-Murcia, Spain

^c Dpto. Cultivos Leñosos, Grupo de Fruticultura, IMIDA, La Alberca, Murcia, Spain

Received 13 August 2007; received in revised form 27 November 2007; accepted 16 January 2008

Abstract

Sweet cherry cultivars have different chilling and heat requirements for breaking rest and flowering. The knowledge of these requirements may be valuable in the selection of the appropriate cultivars for producers and to avoid losses caused by an inadequate cultivar selection in a particular area. Determination of chilling and heat requirements is also important within a breeding programme, when choosing parents to obtain early flowering cultivars. Chilling requirements of seven cherry cultivars growing in south-eastern Spain were calculated using different methods (hours below 7 °C, Utah and Dynamic model), which were compared. Recording hourly average temperatures at several locations during 2 years, the Utah and Dynamic models performed better than hours below 7 °C. Different chilling requirements and slight differences in heat requirements were observed in the studied cultivars. 'Cristobalina' and 'Brooks', the earlier-flowering cultivars, were those with the lowest chilling requirements. 'Burlat', 'New Star' and 'Somerset' had medium chilling and heat requirements for flowering, and 'Marvin' showed the highest values and also the latest blooming date. All the studied cultivars may have their chilling requirements satisfied in the region of Murcia, if grown at least 650 m above sea level. Some cultivars, such as 'Cristobalina' and 'Brooks', could successfully break dormancy already when grown at an altitude above 325 m.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Dormancy; Dynamic model; Flowering; GDH; Hours below 7 °C model; *Prunus avium* L.; Utah model

1. Introduction

A specific knowledge of the influence of climatic conditions on the phenology of cultivated temperate fruits allows farmers to obtain an adequate productivity. Deciduous fruit trees and other woody perennials of temperate climates require a certain amount of winter chilling to overcome their dormancy. Once the chilling requirements have been satisfied, heat is also required to reach full bloom. The lack of chilling reduces vegetative growth and yield (Erez and Couvillon, 1987; Erez, 2000). Temperate fruits are grown in many different environmental conditions and studies concerning chilling and heat requirements of different cultivars are valuable tools to avoid incomplete breaking of dormancy or abnormal flowering.

Various models have been developed to measure the accumulation of winter chilling in deciduous fruit-growing areas:

the Utah method (Richardson et al., 1974); low-requirements method (Gilreath and Buchanan, 1981); Aron method (Aron, 1983); Dynamic method (Erez et al., 1979a,b), etc. However, studies on heat requirements are fewer and the effects on flowering are not well known (Couvillon and Erez, 1985; Citadin et al., 2001; Gariglio et al., 2006).

Traditionally, hours below 7 °C or chilling hours (CH) have been used as the measure of chilling for fruit trees (Weinberger, 1950). The Utah model, proposed by Richardson et al. (1974), is used particularly in cooler areas of temperate zones (Dennis, 2003). This method quantifies the degree of accumulated chilling in chill units (CU). Positive and negative hourly values are accumulated at different rates for each temperature range. Then, net values are added to obtain a specific CU accumulation (Richardson et al., 1974). According to this method, the initial date for CU calculation begins when chilling is consistent and high temperatures are rare (Erez et al., 1979a).

The Dynamic model was proposed by Erez and Couvillon (1987) and was developed for warmer areas than the Utah model. Breakage of dormancy occurs in two steps, the first being

* Corresponding author.

E-mail address: nalbur@cebas.csic.es (N. Alburquerque).

reversible and the second irreversible, and chilling requirements are calculated as chilling portions (CP). As for the Utah model, temperatures have different effects on dormancy. There is also a negative influence of high temperatures, but temperature ranges differ in the two models.

Like other temperate fruits, sweet cherry has chilling and heat requirements for flowering. In recent years, many new sweet cherry cultivars have been released and grown in different environmental conditions. Some of them are early flowering, which is a desirable character in Mediterranean areas to obtain early yield. Although the south-east of Spain is an important fruit-producing area, sweet cherry is not a traditional fruit crop in the region of Murcia. However, nothing prevents this species

from being cultivated in different areas of Murcia with excellent results, if appropriate varieties are chosen.

Little is known about the chilling requirements of sweet cherry. Tabuenca (1983) determined the chilling requirements of some sweet cherry cultivars growing in Zaragoza (Spain), calculated as hours below 7 °C. Mahmood et al. (2000) studied the chilling requirements of three medium-late-ripening sweet cherry cultivars, estimating the chilling needs for each one. However, as far as we know, heat requirements have not been studied in this species.

A consistent and predictable winter chilling accumulation in a particular area is more desirable than year-to-year variability. Knowledge of the chilling accumulation based on several years'

Table 1

Geographical characteristics and average chill units \pm standard error, from data of 8–12 years in 42 weather stations in Murcia (south-eastern Spain)

No.	Station	County	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Chill unit \pm S.E.
1	AL31	Totana	37°43'59"N	1°30'43"W	296	1033 \pm 74
2	AL41	Alhama	37°48'12"N	1°4'0"W	170	774 \pm 36
3	AL51	Librilla	37°54'4"N	1°20'13"W	245	929 \pm 64
4	AL62	Mazarrón	37°32'0"N	1°23'0"W	15	335 \pm 48
5	CR12	Caravaca	38°2'0"N	1°75'0"W	880	1238 \pm 42
6	CR32	Cehegin	38°3'0"N	1°40'0"W	624	903 \pm 35
7	CR42	Moratalla	38°11'53"N	1°48'43"W	466	1158 \pm 41
8	CR52	Cehegin	38°3'0"N	1°51'0"W	527	1086 \pm 28
9	CA21	Murcia	37°50'13"N	1°7'41"W	120	904 \pm 74
10	CA42	Fuente Alamo	37°45'0"N	1°7'41"W	90	843 \pm 58
11	CA52	Cartagena	37°40'52"N	1°4'1"W	120	765 \pm 74
12	CA72	Cartagena	37°37'48"N	0°54'58"W	70	794 \pm 67
13	CA91	Fuente Alamo	37°41'56"N	1°14'17"W	175	794 \pm 49
14	CI22	Abarán	38°14'1"N	1°18'21"W	270	867 \pm 51
15	CI32	Ulea	38°11'28"N	1°15'14"W	306	995 \pm 72
16	CI42	Cieza	38°16'79"N	1°27'79"W	241	889 \pm 40
17	CI52	Calasparra	38°15'33"N	1°43'47"W	290	936 \pm 23
18	JU12	Jumilla	38°23'40"N	1°25'30"W	360	1223 \pm 34
19	JU42	Yecla	38°39'36"N	1°10'55"W	661	1323 \pm 68
20	JU52	Yecla	38°33'45"N	1°6'15"W	690	1164 \pm 37
21	JU61	Jumilla	38°28'0"N	1°19'0"W	525	987 \pm 46
22	JU71	Jumilla	38°34'0"N	1°14'0"W	400	957 \pm 34
23	JU81	Jumilla	38°20'0"N	1°19'0"W	420	989 \pm 43
24	LO11	Lorca	37°36'11"N	1°37'1"W	330	1061 \pm 72
25	LO21	Lorca	37°30'25"N	1°41'42"W	382	1172 \pm 69
26	LO31	Aguilas	37°25'12"N	1°35'28"W	25	507 \pm 57
27	LO41	Lorca	37°51'40"N	1°49'41"W	697	1298 \pm 60
28	LO51	Aguilas	37°29'33"N	1°37'40"W	180	723 \pm 60
29	LO61	Pto. Lumbreras	37°35'5"N	1°42'44"W	450	890 \pm 32
30	MO12	Torres de Cotillas	38°0'50"N	1°17'20"W	169	830 \pm 77
31	MO22	Molina Segura	38°7'2"N	1°11'57"W	150	765 \pm 54
32	MO31	Molina Segura	38°4'0"N	1°14'0"W	180	791 \pm 33
33	MO41	Abanilla	38°10'5"N	0°2'56"W	151	919 \pm 100
34	MO51	Fortuna	38°9'58"N	1°8'53"W	240	839 \pm 76
35	MO61	Ojos	38°7'41"N	1°19'52"W	195	652 \pm 84
36	ML12	Yechar	38°0'0"N	1°3'0"W	320	876 \pm 55
37	ML21	Mula	38°0'0"N	1°3'0"W	320	697 \pm 81
38	MU21	Beniel	38°2'7"N	1°0'28"W	56	888 \pm 78
39	MU31	Murcia	37°53'0"N	1°16'0"W	150	573 \pm 78
40	MU52	Murcia	37°57'47"N	1°0'0"W	210	675 \pm 52
41	MU62	Murcia	37°56'24"N	1°8'5"W	140	853 \pm 90
42	TP81	Murcia	37°48'22"N	1°2'38"W	153	973 \pm 87

data would allow estimation of the probability of satisfying the chilling requirements of sweet cherry cultivars in a given area.

The main goals of this work were to calculate the chilling requirements for breaking the dormancy of seven sweet cherry cultivars, using different methods (the hours below 7 °C, Utah and Dynamic models), and to determine the heat requirements for flowering in south-eastern Spain. With the estimated chilling requirements and the knowledge of the chill accumulation profile in this region during the last 8–12 years, the probability of satisfying chill requirements in relation to the altitude was determined for the sweet cherry cultivars studied in this work. This information can be used to advise sweet cherry farmers about which cultivars are best suited to their area and which areas of our region are the most appropriate for sweet cherry production.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The sweet cherry cultivars assayed were ‘Cristobalina’ (Spain), ‘Brooks’, ‘Ruby’ and ‘Marvin’ (California, USA), ‘Burlat’ (France), ‘New Star’ (Canada) and ‘Somerset’ (New York, USA). The cultivars were chosen because they span the range of flowering time in sweet cherry. All of them were cultivated in Murcia (south-east Spain) under a Mediterranean climate. Most of the cultivars were grown in an experimental field located at Jumilla (see Table 1: station JU12 and Fig. 1), with the exception of ‘Cristobalina’, which was grown in a private orchard located at Abarán (see Table 1: station CI22 and

Fig. 1). All trees were grafted on ‘SL-64’ (*Prunus mahaleb* L.) rootstock.

2.2. Determination of chilling and heat requirements

The chilling requirements necessary for breaking the dormancy of each cultivar were calculated in the field as CH (Weinberger, 1950), CU from the Utah method (Richardson et al., 1974) or CP from the Dynamic model (Erez and Couvillon, 1987).

Heat requirements were calculated as growing degree hours (GDH). GDHs are hourly average temperatures (°C) minus 4.5 °C, accumulated daily (Richardson et al., 1974). For each cultivar, heat requirements were calculated as the number of GDHs accumulated between the end of dormancy and the date when 50% of flowers were open (F^{50}). Both chilling and heat requirements were determined during two consecutive years (2004–2006).

Hourly temperatures were provided by ‘Servicio de Información Agraria de Murcia’ (S.I.A.M.; <http://www.carm.es/cagr/cida/indexsiam.html>). The meteorological stations were located in the experimental field (Jumilla station, code JU12, see Table 1) and very close to the private orchard (Abarán station, code CI22, see Table 1). Table 2 shows maximum and minimum monthly temperatures and rainfall during the autumn–winter season at the sampling sites.

The geographical characteristics of 42 meteorological stations distributed throughout the region of Murcia and the average CU (Utah method) for the data of 8–12 years \pm standard error are shown in Table 1.

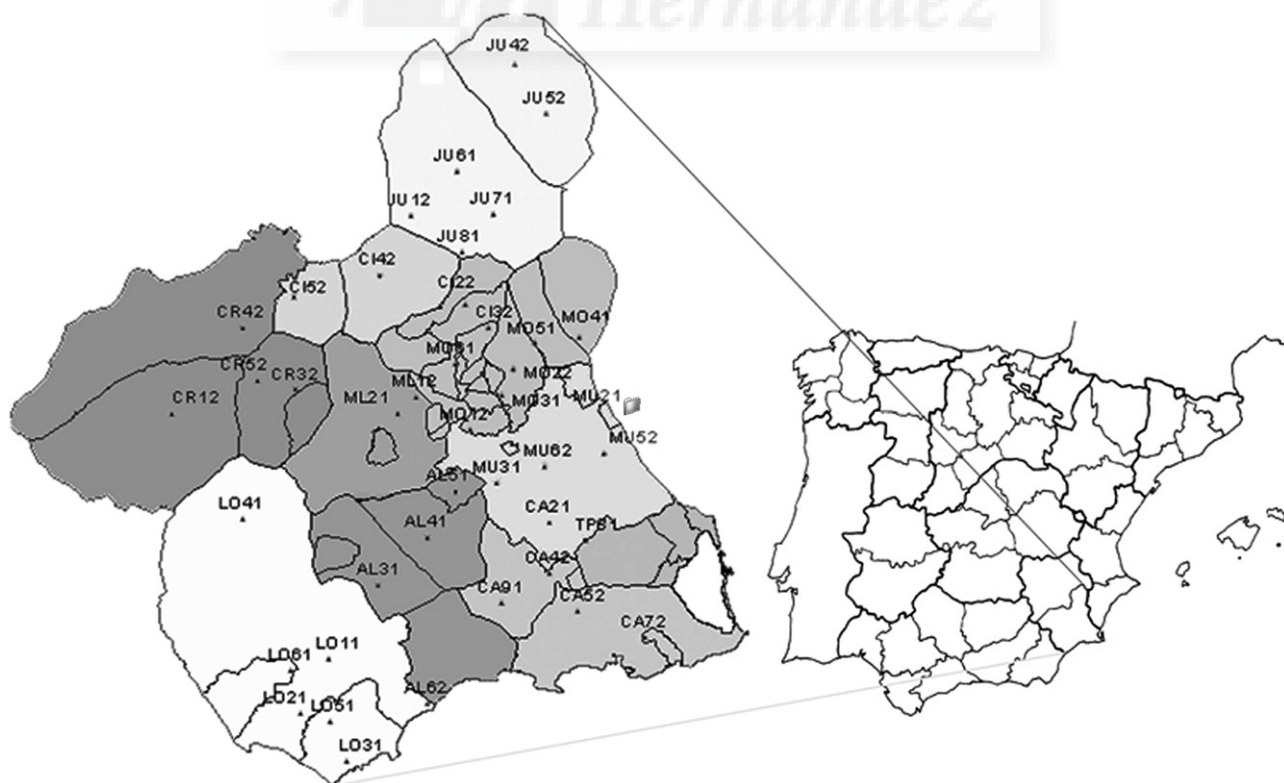


Fig. 1. The location of Murcia in Spain (latitude 38°45' and 37°23'N; longitude 0°41' and 2°21'W) and the meteorological stations distributed in the region.

Table 2
Temperatures, rainfall and chilling calculated by three models at Jumilla and Abarán (Murcia)

Date	Temperature			Rainfall (mm)	Hours <7 °C	Method chill units	Portions
	Mean	Maximum	Minimum				
Jumilla							
November/2004	10.0	13.4	5.5	1.9	162	138	11
December/2004	8.7	14.3	4.5	20.7	199	441	20
January/2005	6.1	12.9	−1.9	1.4	445	386	20
February/2005	6.6	14.9	2.6	13.6	370	223	26
March/2005	11.0	17.0	1.9	7.3	188	0	14
Total					1364	1188	91
November/2005	10.0	15.8	5.2	15.9	186	152	14
December/2005	7.7	13.0	4.1	5.5	319	448	26
January/2006	6.6	10.6	−2.3	46.7	367	525	21
February/2006	8.2	12.6	4.8	12.6	251	226	12
March/2006	13.5	19.3	7.6	0.3	74	0	19
Total					1197	1351	92
Abarán							
November/2004	12.4	15.6	8.2	7.0	74	79	14
December/2004	10.5	15.8	5.8	41.8	104	373	21
January/2005	8.3	15.1	0.3	1.6	303	396	21
February/2005	8.6	18.2	3.8	20.9	262	206	19
March/2005	12.3	19.1	3.6	12.6	140	0	13
Total					883	1054	88
November/2005	12.0	18.8	7.9	26.6	79	138	14
December/2005	9.8	14.4	5.4	9.7	176	394	22
January/2006	8.3	11.8	0.7	46.0	225	496	18
February/2006	10.1	15.1	7.2	19.8	126	190	19
March/2006	15.3	20.5	8.8	0.8	26	0	11
Total					632	1218	84

Source: S.I.A.M. (<http://siam.imida.es/>).

With the data from all years, the probability that chilling requirements would be satisfied was calculated as the percentage of years with enough CU in each station to satisfy the chilling requirements of every cultivar studied. This probability was correlated with the altitude of each station.

2.3. Experimental design

During the 2 years of the study, four branches of each cultivar (30 cm length and 5 mm diameter, approximately) were collected periodically from different trees. The first sample was taken on December 15th and new branches were collected when approximately 100 additional CU had accumulated. Sample collection was more frequent (approximately every 50 CU accumulated) when the accumulated chill became close to the expected value (in most cases from the third collection) until the middle of February.

In the laboratory, the bases of the branches were placed in a 5% sucrose solution, in a growth chamber under controlled conditions (24 ± 1 °C, $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, under cool white fluorescent tubes, and 70% relative humidity). After 10 days in the growth chamber, the phenological stage of the flower buds was tested using the methodology proposed by Baggiolini (1952). The date for breaking of dormancy was established when

40–50% of flower buds were at the advanced Baggiolini stage B (showing petals, Fig. 2) or at the phenological growth stage 55 according to the international BBCH scale (Meier et al., 1994).

Additionally, the weight of the flower buds was recorded after 10 days in the growth chamber. Rest was considered finished when the weight of 20 flower buds increased by at least 20% compared with the previous sampling (Guerrero et al., 2002).

2.4. Statistical analysis

Chilling and heat requirements data (CH, CU, CP and GDHs) were subjected to analysis of variance (ANOVA), with cultivar, year and model as sources of variation to estimate chilling requirements. Means were separated by LSD (0.05). R^2 and the linear regression functions were employed to determine the most suitable model for chilling accumulation and the correlation between average CU (Utah model), over 8–12 years, and the altitude of the meteorological station. All analyses were performed with the SPSS software package v. 11.0 for Windows.

3. Results

Weather data and CH, CU or CP accumulation during two consecutive years at the experimental sites are presented in

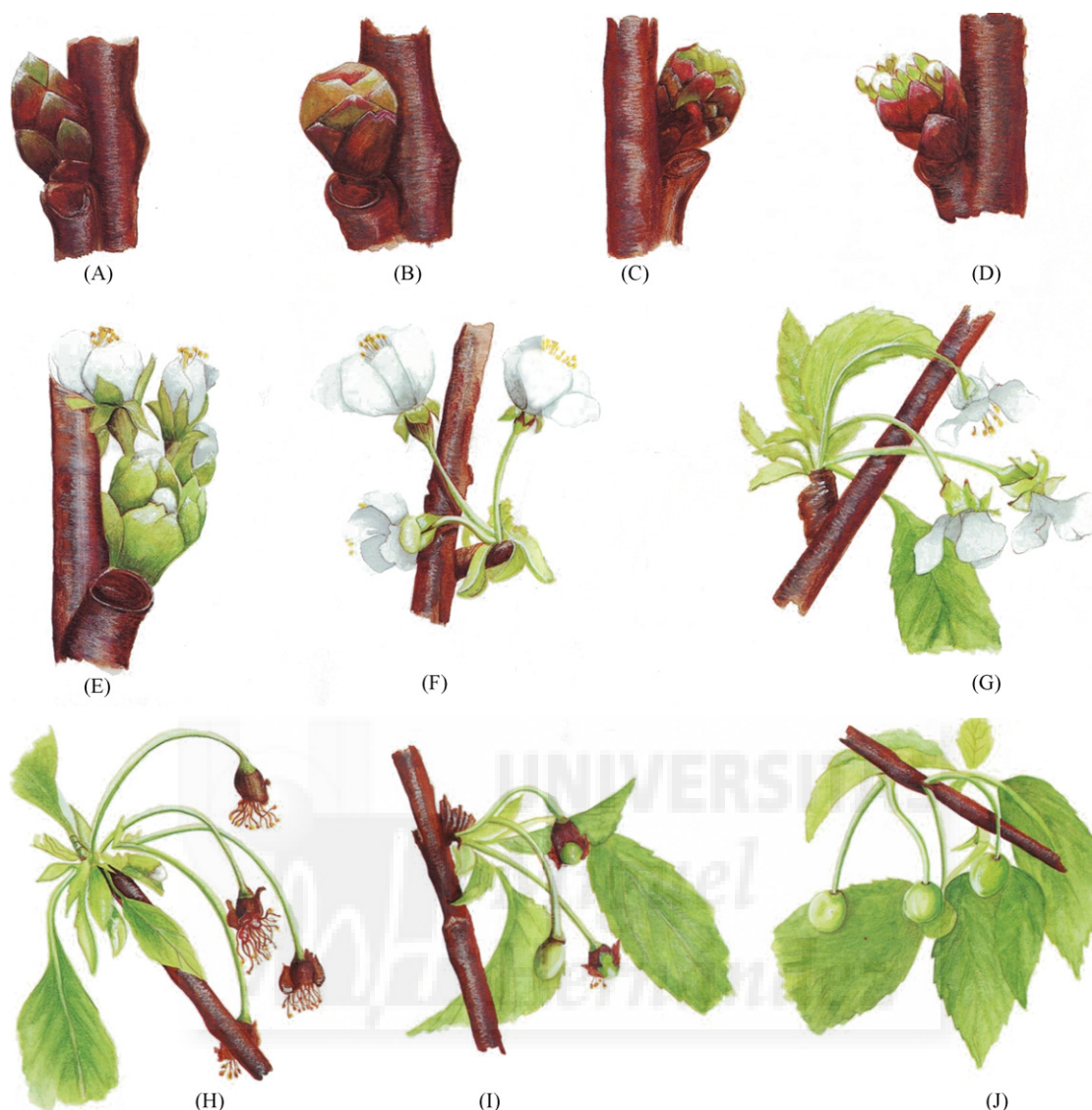


Fig. 2. Phenological growth stages during flowering of sweet cherry according to Baggiolini (1952). Modified from Lichou et al. (1990).

Table 2. The chilling accumulation period in Murcia begins in November, considering the first day of this period as the one after the last negative accumulation (Richardson et al., 1974). The Abarán station is at a lower altitude and is warmer than Jumilla, with less average chill accumulation, calculated from at least 8 years data and by different methods (Table 1). In accordance with this, the location had a strong influence on the accumulated chill during 2005 and 2006 ($P < 0.001$) while the year did not have any effect. Chilling values calculated by the three methods for the whole period studied differed ($P < 0.001$) (Table 2). The interactions model–year and model–location were significant ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively). These differences are mainly due to the results from the hours below 7°C model, which varied greatly between years and locations.

The increase in flower bud fresh weight recorded during the first year of the experiment is shown in Fig. 3. The observed increase coincided with the point when more than 50% of the flower buds were at the advanced Baggiolini B stage, after 10 days at 24°C for all cultivars with the exception of ‘Ruby’. For

this cultivar, an increase of flower bud weight was observed between 700 and 800 CU; however, only after 800 CU were accumulated, had more than 50% of the flower buds reached the B stage of Baggiolini.

Considering the increase in bud fresh weight and phenological observations after 10 days in the laboratory, under controlled conditions, differences in chilling requirements were not found between years, but there were large differences among cultivars ($P < 0.001$). The model and the interaction cultivar–model were also significant ($P < 0.001$). In the climatic conditions of Murcia, the chilling requirements ranged widely (Table 3). ‘Cristobalina’ was the first cultivar to break dormancy followed by ‘Brooks’, ‘Burlat’, ‘Ruby’ and ‘Somerset’ (with similar, medium chilling requirements) whereas the highest chilling requirements were observed for ‘New Star’ and ‘Marvin’.

Correlations between different methods were calculated with the chilling requirement data. Statistical analysis indicated that the Utah and Portions models are well related (Fig. 4A) and differences between years were minor. However, the relationship

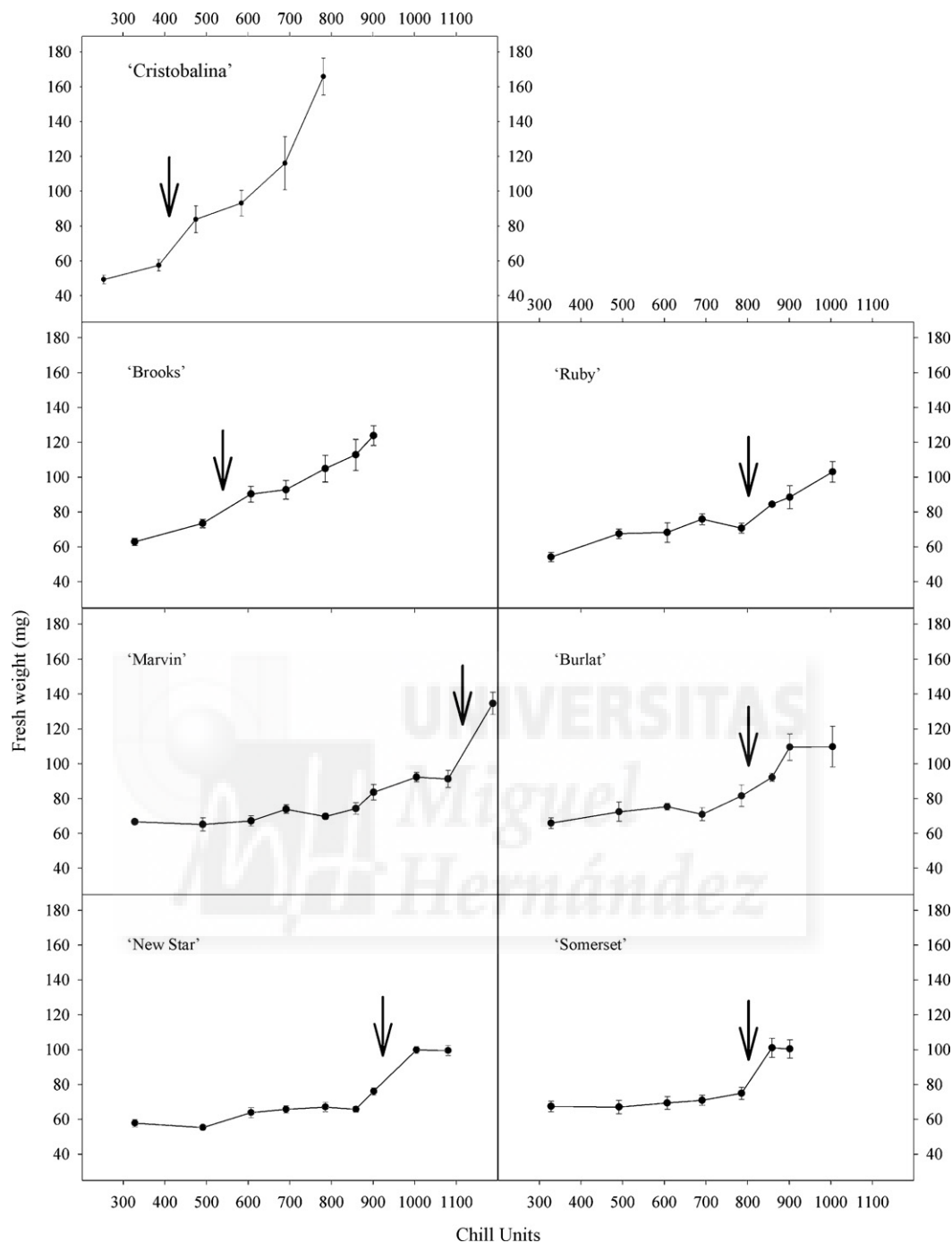


Fig. 3. Fresh weight evolution of flower buds of the sweet cherry cultivars 'Cristobalina', 'Brooks', 'Ruby', 'Marvin', 'Burlat', 'New Star' and 'Somerset', as a function of chilling accumulation (Utah model). Arrows indicate the break of dormancy. Bars represent the standard error.

between chilling requirements calculated as hours below 7 °C and the Utah or Portions models depended on the year (Fig. 4B and C).

Heat accumulation did not differ between years and a great similarity was observed among cultivars, with values in a range between 7326 and 9450 GDH (Table 3). Only 'Ruby' and 'Marvin', with low and high heat requirements, respectively, differed significantly from one another. Differences between years were observed for some cultivars, such as 'Cristobalina'.

There was a good correlation ($R^2=0.629$, linear regression function: $y=700.29+0.71x$) between CU, accumulated at the 42 stations within the region of Murcia, during several years, and altitude for each station (Table 1).

Using the data for each cultivar, percentage of years with enough CU to break rest was plotted against altitude of the stations (Fig. 5). The graphs were then divided vertically into 3 zones, I, II and III, representing a high, medium and low variability of the probability to fulfil chilling requirements, respectively.

Table 3
 Blooming dates, chilling and heat requirements of seven sweet cherry cultivars, calculated at Abarán (Murcia) for ‘Cristobalina’ and at Jumilla (Murcia) for the rest of the cultivars

Cultivar	H < 7 °C	Chill units	Portions	GDH	Blooming date
Cristobalina	176.0 a	397.0 a	30.4 a	9195.0 ab	March 14th
Brooks	411.5 b	556.0 b	36.7 b	7863.2 ab	March 27th
Ruby	618.0 c	806.0 c	48.0 c	7326.2 a	March 29th
Somerset	618.0 c	806.0 c	48.0 c	8625.2 ab	April 3rd
Burlat	618.0 c	806.0 c	48.0 c	8750.2 ab	April 4th
New Star	709.5 cd	909.3 d	53.5 d	8257.0 ab	April 4th
Marvin	788.0 d	1001.5 e	57.6 e	9449.7 b	April 9th

Separation of cultivar means (lower-case letters) by the LSD test ($P \leq 0.05$). Data are averages of two consecutive years.

Table 4
 Land area as a function of altitude in Murcia

Altitude (m)	Area (ha)	Percentage	Accumulated percentage
0–200	169,200	15	15
201–600	485,000	43	58
601–1000	364,100	32	90
1001–2000	113,000	10	100
>2000	0	0	100
Total: 1131,300			

Source: Anuario Estadístico (<http://www.carm.es/econet/publica/anuario/>).

‘Cristobalina’ could be cultivated in almost every area of the region with the exception of those close to the sea, because the percentage of years in which its chilling requirements would be satisfied is 100% at more than 175 m above sea level (Fig. 5). With a very high probability, ‘Brooks’ would not have problems regarding the satisfaction of its chilling requirements above 325 m altitude. In our region, stations located above 450 m would be appropriate for ‘Ruby’, ‘Somerset’ and ‘Burlat’. For ‘New Star’ and ‘Marvin’, the limiting altitudes are 550 and 650 m, respectively. The distribution of areas in Murcia according to altitude is recorded in Table 4. All cultivars studied here could be grown between 600 and 1000 m above sea level, where fulfilment of their chilling requirements would be guaranteed. This represents 32% of the total area of the region. Additionally, most cultivars could be grown at much lower altitudes (up to 200 m), representing 75% of the total area (Table 4).

4. Discussion

The Utah model has been used successfully in cool climates, whereas the Dynamic model seems to better indicate the response of some fruit trees to chilling in warmer and/or subtropical areas (Dennis, 2003). In this study, differences were not found between these two models when estimating the chilling requirements for seven sweet cherry cultivars in north-western Murcia. They were used to calculate approximate flowering dates, taking into account the cultivars’ heat requirements. Mean temperatures during winter are moderate and negative chilling values, generated with the Utah model, are not important, which would explain the similarity to the results obtained with the

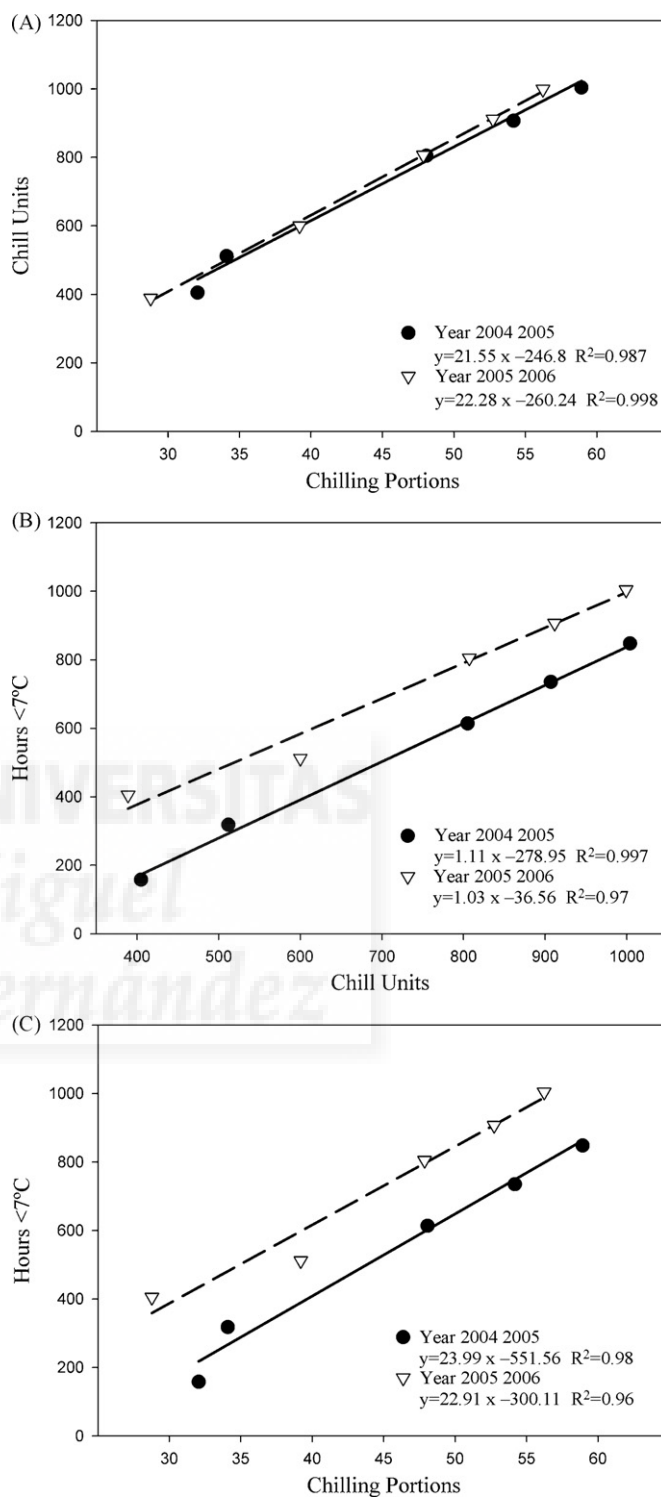


Fig. 4. Correlation between the chilling requirements of seven sweet cherry cultivars, calculated as chill units (Utah model), CP and hours below 7 °C.

Dynamic model. However, the results obtained with the hours below 7 °C model were not correlated with either the Dynamic or the Utah model, suggesting that this model is not appropriate for calculation of sweet cherry chilling requirements in our Mediterranean climatic conditions.

Most work on the determination of chilling requirements in sweet cherry has used the number of hours below 7 °C. It is

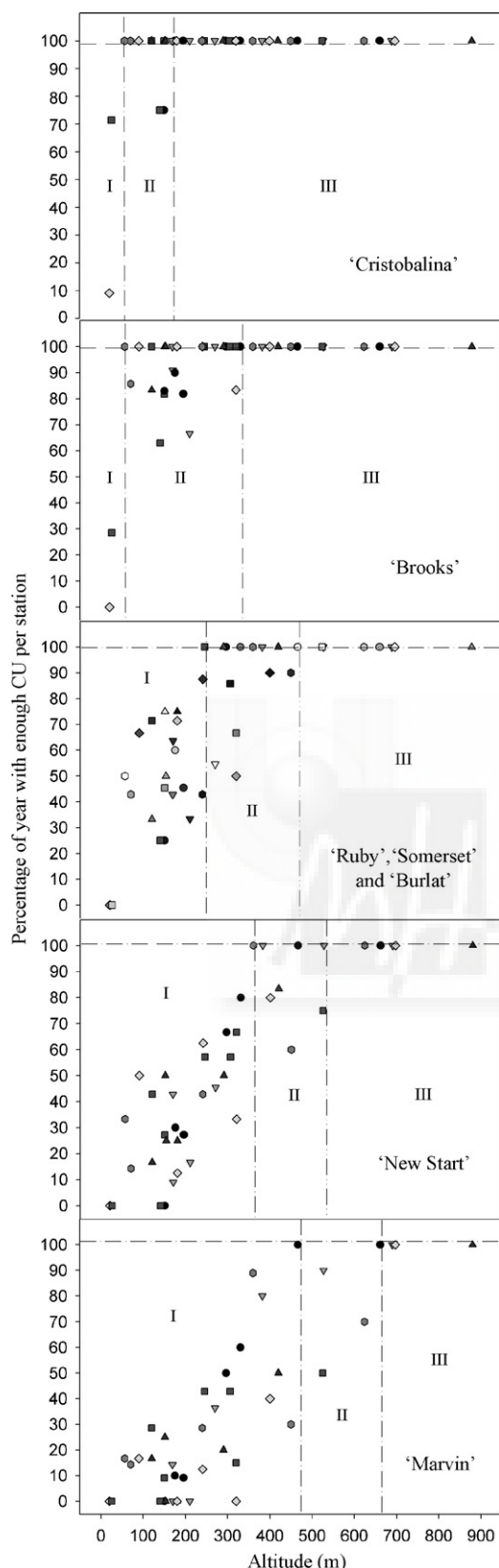


Fig. 5. Percentage of years that chilling requirement for sweet cherry cultivars were satisfied in relation to the altitude where each meteorological station is located, within the region of Murcia. The vertical, discontinuous lines separate three different zones, I, II and III, representing a high, medium and low variability of the probability to fulfil chilling requirements, respectively.

difficult to compare results obtained by different authors since many factors need to be considered, such as the choice of plant material, the criteria used to determine when rest is completed or the environmental conditions during the previous growing season (Dennis, 2003).

Tabuenca (1983) determined that the chilling requirements of the early flowering cultivar 'Cristobalina' were 500–550 h below 7 °C, whereas in this study a value of only 176 h was found for the same cultivar. Some authors have indicated that the Californian cultivars 'Brooks', 'Marvin' and 'Ruby' have low chilling requirements: 200–250 h below 7 °C (Marsall, 1990; Herraiz, 1992; Ballester, 1992). Accordingly, we have found that 'Brooks' had a low chilling requirement, estimated as CH, CU or CP. However, we found different results for 'Ruby' and 'Marvin', which required medium and high chilling accumulation, respectively, to break dormancy. Also, the requirements of the cultivars 'Ruby' and 'Marvin', among others, were estimated by the Utah method (Tersoglio et al., 2006) and the results are in agreement with our findings for these two cultivars. 'Ruby', with less than 950 CU, reached a normal budbreak and 'Marvin' needed more than 1000 CU. Erez (2000) reported that 'Burlat' had CP similar to those that we have estimated in our climatic conditions.

In general, the heat requirements for flowering of the cherry cultivars studied here were high (Table 3) compared with those calculated in other *Prunus* species such as almond (Egea et al., 2003; Alonso et al., 2005). In these studies, some almond cultivars had less than 6000 GDHs ('Desmayo Largueta', 'Constantini' or 'Pou de Felanitx'). A recent work estimated that heat requirements for ten apricot cultivars were under 5900 GDHs (Ruiz et al., 2007). Our data show a narrow range of heat requirements, with a slight increase in the case of the late-flowering cultivar 'Marvin'. Spiegel-Roy and Alston (1979) suggested that the chilling and heat requirements of pear (*Pyrus communis* L.) are closely related to the time of bloom. Chill and heat requirements were found to be interdependent processes (Couvillon and Erez, 1985) and an inverse relationship between the effects of chilling and heat accumulation on the blooming time of peach cultivars was found (Citadin et al., 2001). Greater chilling exposures lead to a reduction of heat requirements. In almond, heat requirements were found to be more important for regulation of blooming time than were chilling requirements in the cold climatic conditions of Zaragoza (north-east Spain), due to the early completion of chilling (Alonso et al., 2005). However, in south-east Spain, the flowering time of some almond cultivars was influenced more by chilling than by heat requirements (Egea et al., 2003). In agreement with this, our results suggest that differences in chilling requirements have a stronger influence on the blooming date than do heat requirements of sweet cherry cultivars, in our climatic conditions, and that the average blooming date of both years was earlier for cultivars with lower chilling requirements but not for those with lower heat requirements, whereas the latest-blooming cultivar needed the highest chill and heat accumulations to flower.

The results show a wide range of chilling requirements for breakage of rest for the cultivars studied, which could be grown successfully in specific areas of the region. This is sup-

ported by the fact that yields per hectare of sweet cherry in the region of Murcia are well above average yields in other regions of Spain (M.A.P.A., 2003, <http://www.mapa.es/es/estadistica/infoestad.html>). Of great interest in Murcia are those cultivars with low or medium chilling requirements, which produce early harvests and fruits of high quality without the cracking problems, that are frequent in areas with abundant rains (Caprio and Quamme, 2006).

Accumulated chilling is affected by the local geography, especially the altitude in tropical and subtropical regions (Ou and Chen, 2000). Accordingly, we have found a positive relationship between chilling accumulation and altitude of different areas in our region. The probability of satisfying the chilling requirements at different altitudes has been determined using climatic information from several years. ‘Cristobalina’, ‘Brooks’, ‘Ruby’, ‘Burlat’ and ‘Somerset’ can be grown with a high probability of chilling requirement satisfaction in wide areas of our region. ‘New Star’ and, particularly, ‘Marvin’ should be grown only in the highest areas of our region, to avoid problems related to lack of chilling. This is confirmed by the fact that all cultivars growing in the experimental station, at 360 m above sea level, flower without problems, with the exception of ‘Marvin’ which frequently shows irregular blooming and yield. Knowledge of the relationship between altitude and chill accumulation in different areas of our region, or at other locations, is of great interest when deciding which sweet cherry cultivars to plant. Further work could involve estimation of the chill and heat requirements of more sweet cherry cultivars, to complete our knowledge of the adaptability of this species to areas where its culture has not been traditional.

Acknowledgements

Authors wish to thank Dr. Jose Egea and Dr. David Walker for critical review of this manuscript. N. Alburquerque was supported by a postdoctoral contract “Juan de la Cierva” from the Spanish Ministry of Education.

References

- Alonso, J.M., Ansón, J.M., Espiau, M.T., Socias i Company, R., 2005. Determination of endodormancy break in almond flower buds by a correlation model using the average temperature of different day intervals and its application to the estimation of chill and heat requirements and blooming date. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 130, 308–318.
- Aron, R., 1983. Availability of chilling temperatures in California. *Agric. Meteorol.* 28, 351–363.
- Baggiolini, M., 1952. Stade repères du pecher. *Revue Romande d’Agriculture, Viticulture et Arboriculture* 4, 29.
- Ballester, A., 1992. El cultivo del cerezo en la Comunidad Valenciana. *Fruticult. Prof.* 49, 31–42.
- Caprio, J.M., Quamme, H.A., 2006. Influence of weather on apricot, peach and sweet cherry production in the Okanagan Valley of British Columbia. *Can. J. Plant Sci.* 86, 259–267.
- Citadin, I., Raseira, M.C.B., Herter, F.G., Baptista da Silva, J., 2001. Heat requirement for blooming and leafing in peach. *Hort. Sci.* 36, 305–307.
- Couvillon, G.A., Erez, A., 1985. Influence of prolonged exposure to chilling temperatures on bud break and heat requirement for bloom of several fruit species. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 110, 47–50.
- Dennis Jr., F.G., 2003. Problems in standardizing methods for evaluating the chilling requirements for the breaking of dormancy in buds of woody plants. *Hort. Sci.* 38, 347–350.
- Egea, J., Ortega, E., Martinez-Gomez, P., Dicenta, F., 2003. Chilling and heat requirements of almond cultivars for flowering. *Environ. Exp. Bot.* 50, 79–85.
- Erez, A., 2000. Bud dormancy: phenomenon, problems and solutions in the tropics and subtropics. In: Erez, A. (Ed.), *Temperate Fruit Crops in Warm Climates*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 28–29.
- Erez, A., Couvillon, G.A., 1987. Characterization of the influence of moderate temperatures on rest completion in peach. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 112, 677–680.
- Erez, A., Couvillon, G.A., Hendershott, C.H., 1979a. The effect of cycle length on chilling negation by high temperatures in dormant peach leaf buds. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 104, 573–576.
- Erez, A., Couvillon, G.A., Hendershott, C.H., 1979b. Quantitative chilling enhancement and negation in peach buds by high temperatures in a daily cycle. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 104, 536–540.
- Gariglio, N., Rossia, D.E.G., Mendow, M., Reig, C., Agusti, M., 2006. Effect of artificial chilling on the depth of endodormancy and vegetative and flower budbreak of peach and nectarine cultivars using excised shoots. *Sci. Hort.* 108, 371–377.
- Gilreath, P.R., Buchanan, D.W., 1981. Rest prediction model for low chilling “Songolds” nectarine. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 106, 426–429.
- Guerrero, R., Viti, R., Monteleone, P., Gentili, M., 2002. la valutazione della dormienza nell’albicocco: tre metodi a confronto. *Frutticoltura* 3, 73–77.
- Herraiz, V., 1992. El cultivo del cerezo en la Comarca de la Almunia. *Fruticult. Prof.* 49, 31–42.
- Lichou, J., Edin, M., Tronel, C., Sounier, R., 1990. *Le Cerisier*. Ctifl, Paris.
- Mahmood, K., Karew, J.G., Hadley, P., Battey, N.H., 2000. Chill unit models for the sweet cherry cvs Stella, Sunburst and Summit. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 75, 602–606.
- Marsall, J., 1990. Plantaciones intensivas o semi-intensivas de cerezo. *Fruticult. Prof.* 30, 55–60.
- Meier, U., Graf, H., Hack, H., Hess, M., Kennel, W., Klose, R., Mappes, D., Seipp, D., Stauss, R., Streif, J., Van den Boom, T., 1994. Phänologische Entwicklungsstadien des Kernobstes (*Malus domestica* Borkh. und *Pyrus communis* L.), des Steinobstes (Prunus-Arten), der Johannisbeere (Ribes-Arten) und der Erdbeere (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* 46, 141–153.
- Ou, S.K., Chen, C.L., 2000. Estimation of the chilling requirement and development of a low-chill model for local peach trees in Taiwan. *J. Chin. Soc. Hort. Sci.* 46, 337–350.
- Richardson, E.A., Seeley, S.D., Walker, D.R., 1974. A model for estimating the completion of rest for ‘Redhaven’ and ‘Elberta’ peach trees. *Hort. Sci.* 1, 331–332.
- Ruiz, D., Campoy, J.A., Egea, J., 2007. Chilling and heat requirements of apricot cultivars for flowering. *Environ. Exp. Bot.* 61, 254–263.
- Spiegel-Roy, P., Alston, F.H., 1979. Chilling and post-dormant heat requirement as selection criteria for late-flowering pears. *J. Hort. Sci.* 54, 115–120.
- Tabuenca, M.C., 1983. Necesidades de frío invernal de variedades de cerezo. *Anales Aula Dei* 16 (3/4), 661–667.
- Tersoglio, E., Naranjo, G., Rivero, L., Quiroga, M., 2006. Requerimiento de frío invernal y de calor en variedades de cerezos. *I TEA* 102, 251–259.
- Weinberger, J.H., 1950. Chilling requirements of peach varieties. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 56, 122–128.



ANEXO II

Short communication. Influence of storage temperature on the viability of sweet cherry pollen

N. Albuquerque^{1*}, F. García Montiel² and L. Burgos¹

¹ Departamento de Mejora de Frutales. CEBAS-CSIC. Apdo. 164. 30100 Murcia. Spain

² CARM. Oficina Comarcal Agraria «Vega Alta». Cieza (Murcia). Spain

Abstract

The conditions to store sweet cherry pollen of six cultivars ('Brooks', 'Cristobalina', 'Marvin', 'New Star', 'Ruby' and 'Somerset') for a long period of time were studied. Pollen samples were stored at 4°C or -20°C and were taken at 7, 15, 30, 60, 90, 180, 270, 365 or 540 days of storage for all cultivars (with the exception of 'Somerset' at 30 days). 'Cristobalina' showed the highest pollen germination (over 60%). For the rest of cultivars, maximum pollen germination ranged from 36% to 44%. Pollen viability was completely lost for most cultivars after only 60 days of storage at 4°C. However, percentages of germinated pollen in all cultivars were not different from the control after one year of storage at -20°C, with the exception of 'New Star' and 'Marvin' that showed a reduction in pollen germination. Storage for periods longer than one year at -20°C produced a decrease in pollen viability with the exception of 'Cristobalina' and 'Somerset' pollen that maintained similar viability at all times. Results indicate that pollen viability could be maintained at reasonably high percentages after storage at -20°C during one year for all cultivars studied.

Additional key words: *in vitro* pollen germination, low temperature storage, *Prunus avium* L.

Resumen

Nota corta. Influencia de la temperatura de conservación sobre la viabilidad del polen de cerezo

Se han estudiado las condiciones de conservación del polen de seis variedades de cerezo ('Brooks', 'Cristobalina', 'Marvin', 'New Star', 'Ruby' y 'Somerset') durante un largo período de almacenamiento. El polen se conservó a 4°C y -20°C y se tomaron muestras a los 7, 15, 30, 60, 90, 180, 270, 365 y 540 días de almacenamiento de todas las variedades, con la excepción de 'Somerset' a los 30 días. 'Cristobalina' mostró los porcentajes de germinación mayores (por encima de 60%). Los valores alcanzados por el resto de las variedades oscilaron entre el 36% y el 44%. La mayoría de las variedades perdieron completamente la viabilidad del polen tan solo a los 60 días de conservación a 4°C. Sin embargo, los porcentajes de germinación del polen conservado a -20°C no variaron después de un año, excepto en las variedades 'New Star' y 'Marvin', que mostraron una reducción en su germinación. La conservación del polen a -20°C durante un periodo superior al año disminuyó la viabilidad del polen, excepto en el caso de 'Cristobalina' y 'Somerset', donde la viabilidad fue similar durante todo el tiempo. De los resultados de este trabajo se puede concluir que la viabilidad del polen de cerezo se puede mantener en porcentajes razonablemente elevados durante un año a -20°C en todas las variedades estudiadas.

Palabras clave adicionales: conservación a bajas temperaturas, germinación del polen *in vitro*, *Prunus avium* L.

Sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit tree can be found in many different countries with a temperate climate, between 35° latitude North and 55° latitude South (Lichou *et al.*, 1990). Fruits are very appreciated for their flavour and beneficial characteristics for health (Serrano *et al.*, 2005).

Pollen viability may decrease quickly depending upon the storage conditions. Mayer *et al.* (1988) found that pollen viability decreased to half after 4 hours at 24°C or 1 hour at 27.7°C.

Controlled cross-pollinations require using selected pollen from elite cherry cultivars, since most of them are self-incompatible and bloom times often do not overlap between cultivars (from 3 to 4 weeks differences between late and early flowering). Due to these differences usually pollen is collected and dried before hand

* Corresponding author: nalbur@cebas.csic.es
Received: 13-07-06; Accepted: 17-01-07.

All authors are members of the SECH.

pollination. Also, exchange of pollen between breeders is a common practice that simplifies most quarantine requirements. Pollen needs adequate storage conditions to avoid losing viability. Viability of *Prunus* pollen, including old sweet cherry cultivars, after storage for long periods of time were carried out and published many years ago (Griggs *et al.*, 1953). However, cultivars studied here are relatively new selections of great interest obtained from different breeding programmes or local Spanish cultivars and, as far as we know, their pollen viability has not been tested before.

In the last years, many new cultivars have been released from different breeding programmes all over the world. Some of them are of low-chilling requirements which would be imperative in most Mediterranean areas. Many of them are being introduced and tested in different conditions, including Mediterranean climate. Here, the conditions to store sweet cherry pollen for a long period of time are studied. Such methodology is useful to efficiently plan hybridizations between cultivars flowering very separately in time.

Pollen of six sweet cherry cultivars, 'Brooks', 'Cristobalina', 'Marvin', 'New Star', 'Ruby' and 'Somerset' were used in this study. Flowers at E stage of Baggiolini (1952), showing the stamens, were collected from the field in Murcia and carried to the laboratory. Anthers were removed from flowers and immediately dehydrated in a chamber under controlled conditions (22°C and 20% RH) during 24–28 hours. After desiccation, 15 mg pollen samples were placed in 1.5 ml eppendorf tubes and stored at 4°C or –20°C.

Pollen samples were taken at 7, 15, 30, 60, 90, 180, 270, 365 or 540 days of storage for all cultivars (with the exception of 'Somerset' at 30 days). Pollen was dusted onto Petri dishes with 25 ml of a medium containing 15% sucrose and 1.2% bactoagar (Remy, 1953; Parfitt and Almehdi, 1984). Since the appropriate temperature for sweet cherry pollen germination was found between 22°C and 25°C (Bargioni, 1980), dishes were incubated for 20 hours at 23°C.

To evaluate pollen germination, an optical microscope with a 40x ocular was used and pollen grains were considered as germinated when the length of the pollen tube exceeded its diameter (Fig. 1).

For each treatment combination (pollen genotype, temperature and storage time), germination was recorded by counting ten different ocular fields with a similar number of pollen grains (35–50 each one), to avoid a possible effect of high pollen density on germination (Kwack, 1965; Giulivo and Ramina, 1974). Each count

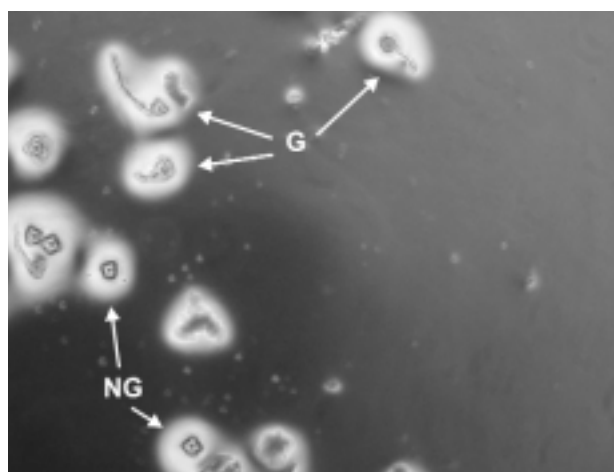


Figure 1. Sweet cherry pollen grains germinated (G) showing the pollen tube and no germinated, without pollen tube (NG).

was considered as a replicate. Germination percentages were transformed by arcsine root square and ANOVA analysis was carried out. Means were compared with the first record after 7 days storage, as the control, using a Dunnett test. Statistical analyses were performed with SAS.

There were significant differences among pollen genotypes, temperatures, time of storage ($P < 0.001$) and all possible interactions were also significant (Table 1). Therefore, the effect of storage time on pollen viability was analysed separately for each cultivar and storage temperature.

Pollen viability decreased after 15 or 30 days of storage at 4°C (Fig. 2). However, pollen remained viable in most cultivars up to one year of storage at –20°C.

When cultivars were studied separately, 'Cristobalina' showed the highest pollen germination (over 60%). For

Table 1. Analysis of variance using GLM procedure for pollen germination *in vitro* of six cherry genotypes

Source	d.f.	F value	Pr > F
Pollen genotype	5	310.63	< 0.0001
Temperature	1	1,212.95	< 0.0001
Storage time	8	215.51	< 0.0001
Pollen genotype × temperature	5	23.24	< 0.0001
Pollen genotype × storage time	39	10.72	< 0.0001
Temperature × storage time	8	152.98	< 0.0001
Pollen genotype × temperature × storage time	36	9.22	< 0.0001
Error	927		

d.f.: degrees of freedom.

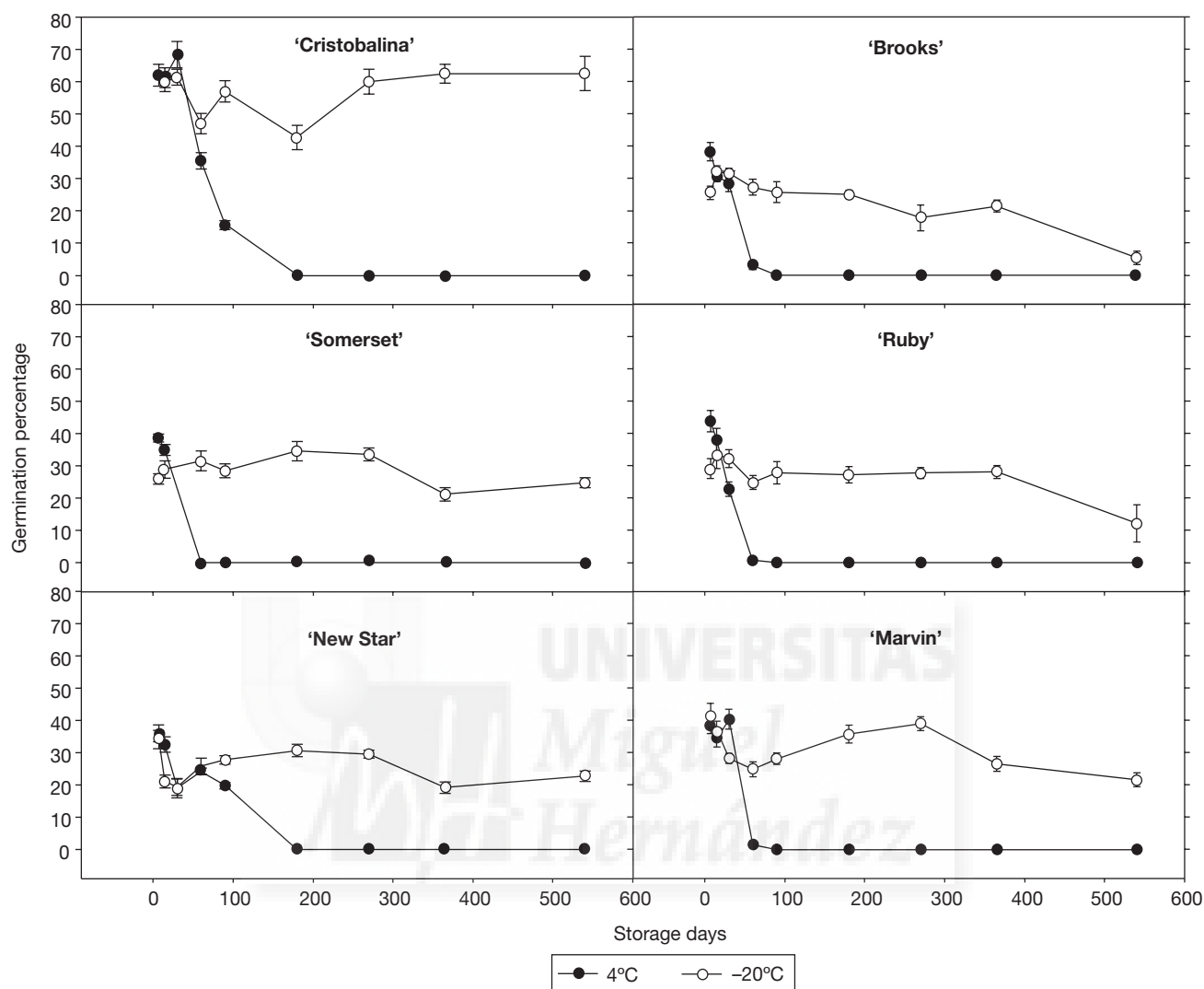


Figure 2. *In vitro* germination of pollen grains of six sweet cherry genotypes after storage at 4°C or -20°C during different periods of time. Vertical bars represent the standard error and the absence of bars indicates that the standard error was zero.

the rest of cultivars, maximum pollen germination ranged from 35.98% to 43.76%. The relatively low germination percentages found with these cultivars contrast with those reported by Bargioni and Cossio (1980) who found germination values between 70% and 80% for the cherry cultivars. However, results from this work are in agreement with those found by Hedhly *et al.* (2005), who studied pollen germination of nine sweet cherry cultivars testing *in vitro* pollen performance under two temperatures regimes (15°C and 30°C). They found a highly significant effect of pollen genotype and temperature. Higher temperature reduced pollen germination, which maximum values were between approximately 40% in 'Talaguera Brillante' and 'Ambrunés' cultivars and 70% in 'Van' or 'Bing'

cultivars. Also differences in pollen performance have been found in different genotypes of sweet cherry by Hormaza and Herrero (1999) or in other *Prunus* species such as apricot (Egea *et al.*, 1992) and almond (Martínez-Gómez *et al.*, 2002).

In this study, for most cultivars pollen completely lost viability after only 60 days of storage at 4°C. Remarkably, 'Cristobalina' and 'New Star' maintained viable pollen in relatively high percentages up to one more month at this temperature.

Pollen viability in all cultivars was not different from the control after one year of storage at -20°C, with the exception of 'New Star' and 'Marvin' pollen which viability was significantly lower after 365 days from the first recorded germination percentage measured

after 7 days. However, results at 365 days were not significantly different from those obtained at some of the previous sampling days (i.e. 30, 60 or 90 days). Pollen from 'Marvin' and 'New Star' stored at -20°C showed a lower viability after 30 days than after 180 and 270 days. A high density of pollen grains in the culture medium has been described to have a positive influence on pollen germination (Kwack, 1965; Giulivo and Ramina, 1974). Although care was taken to uniformly distribute pollen grains and to choose ocular field where a similar number of pollen grains was present, small differences could explain the unexpected results observed.

Fogle (1975) and Brown *et al.* (1996) indicated that freezing or freeze-drying of cherry pollen, in general, delays loss of viability when the pollen is stored for many years. In this study pollen germination remained similar in the case of 'Cristobalina' and 'Somerset' after storage for periods longer than one year at -20°C . However, pollen germination was reduced in 'Brooks', 'Marvin', 'New Star' and 'Ruby' after 540 days of storage at -20°C , which was approximately half of that recorded in the control. Griggs *et al.* (1953) found a slight decrease of germination percentages in pollen of 'Black Tartarian' and 'Napoleon' cultivars stored more than 400 days at -18°C . All these results seem to indicate that pollen viability can be affected by long periods of storage at approximately -20°C , being this effect genotype dependent.

Low temperature storage of pollen has been studied in some species. Martínez-Gómez *et al.* (2000) indicated that pollen of two almond cultivars was viable during 8 weeks when was stored at 4°C . This results were confirmed later with four different almond cultivars (Martínez-Gómez *et al.*, 2002) and also the authors found that storage conditions below 0°C (-20°C and -80°C) did not affect pollen germination after one year. In a recent work, Lora *et al.* (2006) observed that germination of cherimoya pollen stored at sub-zero temperatures (-20 , -80 and -196°C) was progressively reduced with conservation time at three temperatures studied, reaching a minimum after 90 days of storage. No differences in pollen germination among temperatures were observed for up to 30 days.

From results in this work it can be concluded that storage at -20°C during one year does not affect pollen viability of the cultivars 'Cristobalina', 'Brooks', 'Somerset' and 'Ruby', whereas viability was still relatively high for the rest of cultivars.

Although there are some previous studies on the storage of pollen from cherry cultivars for short or long

periods of time at different temperatures, to our knowledge, cultivars studied here have been tested for the first time since they are relatively new selections from breeding programmes or self-compatible and early-ripening local Spanish cultivars. A procedure to appropriately conserve pollen, maintaining a good viability, may allow a better planning of controlled crosses and also provide a way of exchanging pollen between breeding programmes.

References

- BAGGIOLINI M., 1952. Stade repères du pecher. Revue Romande d'Agriculture, Viticulture et Arboriculture 4, 29.
- BARGIONI G., 1980. La pollinisation du cerisier. Proc. Intl. Symp. La culture du cerisier. Gembloux, France. pp. 178-190.
- BARGIONI G., COSSIO F., 1980. Cited by Lichou *et al.*, in Le cerisier, 1990. Ed. Ctifl, Paris, France. pp. 56-58.
- BROWN S.K., IEZZONI, A.F. FOGLE H.W., 1996. Cherries. In: Fruit breeding I: tree and tropical fruits (Janick J., Moore J.N., eds). Ed. Purdue Univ. Press. W. Lafayette, IN., USA. pp. 213-255.
- EGEA J., BURGOS L., ZOROAN, EGEE L., 1992. Influence of temperature on the *in vitro* germination of pollen of apricot (*Prunus armeniaca* L.). J Hort Sci 67, 247-250.
- FOGLE H.W., 1975. Cherries. In: Advances in fruit breeding (Janick J., Moore J.N., eds). Ed. Purdue Univ. Press. W. Lafayette, IN., USA. pp. 348-366.
- GIULIVO C., RAMINA A., 1974. Effeto di masa de azione del calcio sulla germinazione del polline di alcune specie arboree da frutto. Riv Ortoflorofruitt It 58, 3-13.
- GRIGGS W.H., VANSSELL H., IWAKIRI B.T., 1953. The storage of hand-collected and bee-collected pollen in a home freezer. Proc Amer Soc Hort Sci 62, 304-305.
- HEDHLY A., HORMAZA J.I., HERRERO M., 2005. Influence of genotype-temperature interaction on pollen performance. J Evol Biol 18, 1494-1502.
- HORMAZA J.I., HERRERO M., 1999. Pollen performance as affected by the pistilar genotype in sweet cherry (*Prunus avium* L.). Protoplasma 208, 129-135.
- KWACK B.H., 1965. The effect of calcium on pollen germination. Proc Amer Soc Hort Sci 86, 818-823.
- LICHOU J., EDIN M., TRONEL C., SAUNIER R., 1990. L'espece. In: Le cerisier. Ed. Ctifl, Paris. 39 pp.
- LORA J., PÉREZ DE OTEYZA M.A., FUENTETAJA P., HORMAZA J.I., 2006. Low temperature storage and *in vitro* germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) pollen. Sci Hort 108, 91-94.
- MAYER D., RATHBONE L., MILICZKY E.M., 1988. New ideas in cherry pollination. Proc Ann Mtg Wash St Hort Ass. pp. 228-229.
- MARTÍNEZ-GÓMEZ P., GRADZIEL T.M., ORTEGA E., DICENTA F., 2000. Short-term storage of almond pollen. HortScience 35, 1151-1152.

- MARTÍNEZ-GÓMEZ P., GRADZIEL T.M., ORTEGA E., DICENTA F., 2002. Low temperature storage of almond pollen. HortScience 37, 691-692.
- PARFITT D.E., ALMEHDI A., 1984. Liquid nitrogen storage of pollen from five cultivated Prunus species. HortScience 19, 69-70.
- REMY P., 1953. Contribution a l'étude du pollen der arbres fruitiers a noyau, genre *Prunus*. Ann Amelior Plantes 3, 351-388.
- SERRANO M., GUILLÉN F., MARTÍNEZ-ROMERO D., CASTILLO S., VALERO D., 2005. Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. J Agr Food Chem 53, 2741-2745.





ANEXO III

Secretaría del Congreso

De: "Lorenzo Burgos" <burgos@cebas.csic.es>
Para: "Nuria Alburquerque" <nalbur@cebas.csic.es>
CC: "Blas Beorlegui, Carmen de" <cblas@inia.es>
Enviado: 11 March 2010 10:13
Asunto: RE: SJAR 09-314

Estimada Dr. Alburquerque,

Tras considerar las modificaciones realizadas en su manuscrito me complace comunicarle que este es aceptable para su publicación en el Spanish Journal of Agricultural Research.

Es posible que se le soliciten cambios adicionales desde la Editorial. Estos estarían relacionados con aspectos formales de la publicación.

Atentamente,

Dr. Lorenzo Burgos
Profesor de Investigación
Grupo de Biotecnología de Frutales
Departamento de Mejora Vegetal
CEBAS-CSIC
Aptd. de Correos 164, 30100-Murcia (Spain)
Tlfn. +34 968 39 63 17
Fax. +34 968 39 62 13

De: Nuria Alburquerque [mailto:nalbur@cebas.csic.es]

Enviado el: 10 March 2010 10:10

Para: Lorenzo Burgos

Asunto: Re: SJAR 09-314

Estimado Dr. Burgos,

le envío adjunta la versión revisada del manuscrito SJAR 314-09 en la que se han incluido las modificaciones sugeridas en su última carta. Igualmente se adjunta una carta explicando con detalle los cambios realizados.

Esperamos que la nueva versión del artículo sea aceptable para su publicación en el Spanish Journal of Agricultural Research.

Deseamos agradecer la evaluación realizada y las mejoras sugeridas, que han sido muy útiles para *mejorar la calidad del manuscrito*.

Atentamente

Dra. Nuria Alburquerque
 Científico Titular
 Departamento de Mejora de Frutales
 Grupo de Biotecnología
 CEBAS-CSIC
 Aptd. de Correos 164, 30100-Murcia (Spain)
 Tlfn. +34 968 39 63 73
 Fax. +34 968 39 62 13

----- Original Message -----

From: [Lorenzo Burgos](#)
To: [Nuria Alburquerque](#)
Cc: 'Blas Beorlegui, Carmen de'; joan.bonany@irta.es
Sent: Monday, March 08, 2010 11:07 AM
Subject: SJAR 09-314

Estimada Dra. Alburquerque,

La versión revisada de su manuscrito con referencia SJAR 09-314 ha mejorado mucho la calidad general del manuscrito. Aunque ustedes han respondido a todas las sugerencias realizadas por los evaluadores de manera satisfactoria yo aun detecto algunos cambios menores que requieren ser

realizados antes de que el manuscrito pueda ser aceptado para su publicación. Estos cambios y sugerencias los encontrará en la versión anotada que le envío en papel.
Esperando recibir una versión modificada de su manuscrito,
Atentamente,

Dr. Lorenzo Burgos
Profesor de Investigación
Grupo de Biotecnología de Frutales
Departamento de Mejora Vegetal
CEBAS-CSIC
Aptd. de Correos 164, 30100-Murcia (Spain)
Tfn. +34 968 39 63 17
Fax. +34 968 39 62 13





Factors influencing fruit set and quality in different sweet cherry cultivars

F. García Montiel¹, M. Serrano², D. Martínez-Romero³, and N. Alburquerque^{4*}

¹*Departamento de Biología Aplicada. EPSO, Universidad Miguel Hernández. Ctra. Beniel Km 3,2, 03312 Orihuela (Alicante), Spain*

²*CARM, Oficina Comarcal Agraria "Vega Alta". Cieza (Murcia), Spain*

³*Departamento de Tecnología de Alimentos. EPSO, Universidad Miguel Hernández. Ctra. Beniel Km 3,2, 03312 Orihuela (Alicante), Spain*

⁴*Departamento de Mejora Vegetal. Grupo de Biotecnología de frutales. CEBAS-CSIC. Apart. 164, 30100 Murcia, Spain*

* Corresponding author: nalbur@cebas.csic.es. phone number: 968396373. Fax number: 968396213

Short title: Influence of factors on sweet cherry fruit set and quality

Topic: Plant production

Number of figures: 7, number of tables: 3

All authors are members of the Sociedad Española de Ciencias Hortícolas.

Abstract

The aim of this work is the characterisation of seven cultivars of sweet cherry grown at Murcia (Spain). The cultivars 'Brooks', 'Marvin', 'Ruby', 'Burlat', 'New Star' and 'Somerset' were grown in an experimental field located at Jumilla, whereas 'Cristobalina' was grown in a private orchard located at Abarán. Flower density, flower buds drop, number of developing flower buds and total number of flowers per node, fruit set and percentage of double fruits have been determined from 2004 to 2007. Also some parameters related to fruit quality, such as fruit weight, colour, soluble solids, total acidity and firmness were evaluated at different ripening stages. The number of flower buds per node, total number of flowers per node, fruit set and percentage of double fruits had a great



variability between cultivars and the year also had a strong influence in these parameters, with the exception of double fruit production. Likewise, all fruit quality parameters were very different between cultivars and ripening stages. The cultivar 'Brooks' shows high production of flower buds and an appropriate total number of flowers per node in different years, besides high levels of total soluble solids (TSS), ripening index and fruit firmness. 'Burlat' and 'Somerset' ranged medium values of most of the analyzed floral biology and fruit quality parameters. In 'Cristobalina' and 'Marvin' the production of flower buds and total number of flowers per node in different years was acceptable. In addition, the self-compatible cultivar 'Cristobalina' had high fruit set percentages in all years of study, but the fruit size and the fruit firmness values were low. In 'Marvin' the percentage of double fruits was low. The maturation period of 'Marvin' fruits was very short and at the commercial ripening stage these fruits showed the darkest red colour. Although 'Ruby' recorded high production of flower buds and total number of flower per node in different years, the fruit set was very erratic and the percentage of double fruits was high. This cultivar presented a good ripening index and fruit firmness levels. The self-compatible cultivar 'New Star' is characterized by the consistent high fruit set percentages and low percentage of double fruits as well as the good fruit size and firmness levels.

Since the interest of breeders is diverse, the knowledge of floral biology, fruit set behaviour or fruit quality of the cultivars studied here could be useful to choose the appropriate ones to be grown under Mediterranean climatic conditions or used as parentals in future breeding programs.

Keywords: flower buds, fruit set, fruit quality, breeding.

Resumen

En este trabajo se ha realizado la caracterización pomológica de siete variedades de cerezo, cultivadas en la Región de Murcia. Las variedades 'Brooks', 'Marvin', 'Ruby', 'Burlat', 'New Star' y 'Somerset' se encuentran en una finca experimental en Jumilla, mientras que 'Cristobalina' es cultivada en un huerto situado en Abarán. Se han determinado parámetros florales como densidad de yemas de flor, número de yemas de flor y número total de flores por ramillete, caída de yemas, porcentaje de cuajado de frutos y de frutos dobles desde 2004 hasta 2007. También se determinaron algunos parámetros relacionados con la calidad de las cerezas, como peso, color, sólidos solubles, acidez total y firmeza. Tanto el número de yemas de flor y número total de flores por ramillete como el cuajado y el porcentaje de frutos dobles fueron diferentes entre variedades y también entre años, excepto en el caso del porcentaje de frutos dobles. Asimismo, todos los parámetros de calidad de fruto estudiados diferían entre variedades y estados de madurez. La variedad 'Brooks' además de mostrar una elevada producción de yemas florales y un número



adecuado de flores por ramillete, registró altos niveles de sólidos solubles totales, índice de madurez y firmeza. ‘Burlat’ y ‘Somerset’ alcanzaron valores medios en la mayoría de los parámetros de biología floral y calidad de fruto analizados. En ‘Cristobalina’ y ‘Marvin’, tanto la producción de yemas de flor como de flores totales por ramillete en diferentes años fue adecuada. Además, en la variedad autocompatible ‘Cristobalina’ el porcentaje de cuajado de frutos fue elevado en todos los años de estudio, aunque el tamaño de la cereza y sus valores de firmeza fueron muy bajos. ‘Marvin’ presentó un porcentaje de frutos dobles bajo, un período de maduración bastante corto y fue la variedad que presentó el color rojo más oscuro. ‘Ruby’ tuvo un elevado número de yemas de flor y de flores totales por ramillete, sin embargo el cuajado de frutos fue muy errático y la presencia de frutos dobles importante. Esta variedad registró un buen índice de madurez, así como buena firmeza. La variedad autocompatible ‘New Star’ destacó por los elevados porcentajes de cuajado y escasez de frutos dobles, además de buen tamaño de los frutos y elevada firmeza.

Debido a que el interés de los mejoradores es diverso, el conocimiento de la biología floral, el cuajado de frutos o la calidad de los frutos de las variedades de cerezo estudiadas en este trabajo podría ser útil para elegir las variedades que se pueden adaptar bien a las condiciones de clima mediterráneo y elegir buenas candidatas como parentales en futuros programas de mejora.

Palabras clave: yemas de flor, cuajado, calidad del fruto, mejora genética.

Introduction

Sweet cherry (*Prunus avium* L.) is one of the most appreciated fruit by consumer due to its excellent quality. Spain is one of the main cherry producers in Europe, with production of 75,738 t in 2007, which represents 14% of the total in the European Union (MAPYA, 2008). This is an interesting alternative crop in southeast of Spain because it is complementary to apricot, plum or early peach. This species needs less water and nitrogen supply than other tree crops and it is tolerant to *Plum Pox* Virus (Sharka), which is an important problem in apricot, peach and plum.

In the last years, many new cultivars have been released from different breeding programmes all over the world. The interest of breeders is diverse but the knowledge of different aspects such as floral biology, fruit set behaviour or fruit quality of each cultivar could help them to choose the appropriate cultivars to be grown in a particular area with specific climatic conditions or as parentals in a breeding program. There are many factors related to floral biology of fruit trees that influence productivity, such as flower bud density, flower bud drop, flower quality or fruit set. Although problems related to poor yields are frequently found in some sweet cherry cultivars, there are few studies on floral



biology that could help to better understand the cause of these problems. Thus, in different cultivars of *Prunus* species such as apricot or sour cherry, the influence of weather conditions on pollination, ovule longevity and fruit set has been studied in many fruit varieties (Burgos and Egea, 1993; Guerriero *et al.*, 1985; Furukawa and Bukovac, 1989). Also the flower bud production has been studied in several cultivars of peach and nectarine (Bellini and Gianelli, 1975; Okie and Werner, 1996) or apricot (Alburquerque *et al.*, 2004; Ruiz and Egea, 2008).

Other factor that may have a negative effect on fruit production and yield is the flower bud drop. Although the causes for high percentages of flower bud drop appear diverse (climatic conditions, chilling requirements, frost, etc.), this trait has been found as genotype-dependent in some apricot cultivars (Legave, 1975; Legave *et al.*, 1982; Alburquerque *et al.*, 2004; Ruiz and Egea, 2008).

Particularly in sour or sweet cherry there are some components that contribute to fruit set and yield, such as the number of flowers per bud and the number of flowering nodes per branch (Iezzoni and Mulnix, 1992). Early drop of flowers is a normal process in many species (Guitian, 1993), which decreases fruit set, being an important factor on determining the final yield of fruit species. The influence of different factors such as climatic conditions or genotype, on fruit set has been studied in different fruit crops including sweet cherry (Caprio and Quamme, 1998; Hedhly *et al.*, 2003; Alburquerque *et al.*, 2004; Choi and Andersen, 2001).

Sweet cherry is highly appreciated by consumers due to its excellent quality. Although the concept of “fruit quality” depends on the product itself and the consumer’s preferences, it is widely accepted that the main characteristics related to sweet cherry quality are fruit weight, colour, firmness, sweetness, sourness, flavour and aroma with important differences among cultivars (Romano *et al.*, 2006; Díaz-Mula *et al.*, 2009). Thus, fruit quality parameters, together with floral biology aspects, are important factors to be taking into account to choose parentals for a breeding programme.

In this study, seven sweet cherry cultivars, including one local variety, were chosen as representative of different flowering times and productivity to analyse the influence of the cultivar on flower buds production, the number of flower buds per node, flower buds drop, the total number of flowers per node and fruit set. These parameters were studied to establish their variability and the effect on crop productivity. In addition, same parameters related to fruit quality such as colour changes, the soluble solids content, total acidity and firmness were studied at different ripening stages.



Materials and methods

Plant material

The sweet cherry cultivars assayed were 'Brooks', 'Marvin' (also called '4-70') and 'Ruby' (California-USA), 'Burlat' (France), 'New Star' (Canada), 'Somerset' (New York-USA) and 'Cristobalina' (Spain). The cultivars were chosen because they span the range of flowering time when cultivated in Murcia (South-East Spain) under the Mediterranean climate. Most of the cultivars were grown in an experimental field located at Jumilla, with the exception of 'Cristobalina', which was grown in a private orchard located at Abarán and all of them were grafted on 'SL-64' (*Prunus mahaleb* L.) rootstock. Cultivars were planted in 1999 and planting distance was 5 m x 3 m. The averages of the annual production during the experiment were 18-20 Kg/tree for 'Marvin', 20-25 kg/tree for 'Burlat' and 'Brooks', 30-35 kg/tree for 'Somerset', 35-40 kg/tree for 'Ruby' and 'New Star' and more than 40 kg/tree for 'Cristobalina'.

'New Star' and 'Cristobalina' are self-compatible and the rest are self-incompatible, although they have overlapping blooming periods, showing genetic compatibility with each other.

Culture conditions

Hourly temperatures were provided by 'Servicio de Información Agraria de Murcia' (S.I.A.M.; <http://www.carm.es/cagr/cida/indexsiam.html>). The meteorological stations were located in the experimental field at Jumilla and very close to the private orchard at Abarán. Table 1 shows average maximum and minimum, rainfall and total chill units at the sampling sites from 2004 to 2007. Chilling requirements, flowering and harvest time were recorded for all cultivars in Jumilla and Abarán during two consecutive years (2004 and 2005, Table 2).

In both experimental fields the irrigation treatments were carried out using a drip irrigation system with two emitters (each delivering 4 L/h) per tree. Total water amounts applied were 3675 m³/ha and the fertilization doses were 50 Kg/ha of nitrogen, 80 Kg/ha of phosphorus and 120 Kg/ha of potassium (33.5% N, 18% P₂O₅ and 46% K₂O).

Experimental design

The experimental orchards contained six trees of each cultivar in a completely randomised design. Three trees per cultivar were randomly chosen. Two branches with 'bouquets of May' inserted on two years old wood of similar size per tree were selected and marked after fall defoliation. At the stage B (Baggiolini, 1952, modified by Lichou *et al.*, 1990) when the flower buds were easily identified, "flower bud density" was recorded in the six chosen branches and expressed as number of flower buds per cm of branch, in order to measure flower bud production. Total number of flower buds at stage D (Lichou *et*



al., 1990) was also recorded, as well as the percentage of dropped flower buds in those branches (flower buds drop). The number of flower bud per node or per ‘bouquet of May’ was determined and, due to the different number of flowers that have cherry flower buds, total number of flowers per node or per ‘bouquet of May’ was determined at bloom (when flowers were opened). Fruit set percentage was calculated as the number of fruits at harvest date per total remaining flowers at bloom (Albuquerque *et al.*, 2004). Also the percentage of double fruits was determined in ‘Brooks’, ‘Burlat’, ‘Marvin’, ‘New Star’, ‘Ruby’ and ‘Somerset’ as the number of double fruits per total number of fruits in six different branches of each cultivar, which had at least 50 fruits.

Flower bud density, flower buds drop, number of flower buds per node, total number of flowers per node and fruit set were observed during three consecutive years (2005, 2006 and 2007) for all cultivars. ‘Brooks’, ‘Marvin’ and ‘Ruby’ were also sampled in 2004. The percentage of double fruits and cracking sensitivity was recorded in 2005, 2006 and 2007 for all cultivars, with the exception of ‘Cristobalina’.

Fruit quality parameters

For each cultivar 18 homogeneous fruits were harvested at four ripening stages (S1 to S4), according to fruit colour and size. Cherry fruit at S1 were in the last growth phase having a light red color, while at S4 they have reached the commercial ripening stage to be harvested. Thus, S1-S4 corresponded to S11-S14 stages described for cherry fruit growth and ripening on tree by Serrano *et al.* (2005a). Fruit weight, firmness, and colour were measured individually in each fruit, and data are the mean \pm SE (n=18). Then, three subsamples of 6 fruits were made at random, and then the edible portion was cut in small pieces to obtain 3 homogenous subsamples for each cultivar and ripening stage, in which soluble solid content (TSS) and total acidity (TA) were determined. The weight for each fruit was determined using a digital balance (ST-360 Gram Precision, Spain) with two significant figures and results were the mean \pm SE. Fruit firmness was determined using a TX-XT2i Texture Analyzer (Stable Microsystems, Godalming, UK) interfaced to a personal computer, with a flat steel plate mounted on the machine. For each fruit, the cheek diameter was measured and then a force that achieved a 3% deformation of the fruit diameter was applied. Results were expressed as the ratio between this force and the covered distance (N mm^{-1}) and were the mean \pm SE. This determination of firmness as the slope of the force-deformation curve has been chosen as the most characteristic parameter for textural changes in cherry fruits (Serrano *et al.*, 2005a; Muskovics *et al.*, 2006). Three colour determinations were made on each fruit at 120° interval along the equatorial perimeter using the Hunter Lab System (L*, a*, b*) in a Minolta colorimeter CR200 model (Minolta Camera Co., Osaka, Japan). TSS was determined in duplicate from the juice obtained from each subsample with a digital refractometer Atago PR-101 (Atago Co. Ltd.,



Japan) at 20 °C and results expressed as the mean \pm SE in °Brix. TA was determined from the above juice by potentiometric titration with 0.1 N NaOH (0.998 factor) up to pH 8.1, using 1 mL of diluted juice in 25 mL distilled H₂O according to Serrano *et al.* (2009). Results were the mean \pm SE expressed as g of malic acid equivalent 100 g⁻¹ fresh weight.

Statistical analysis

Data of flower bud density, flower buds drop, number of flower buds and total number of flowers per node, fruit set, percentage of double fruits, the colour determinations, the soluble solids, total acidity and firmness were statistically analysed by the general lineal model (GLM) using SAS GLM version 8 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Percentages were transformed by arcsine root square and ANOVA analysis was carried out. When necessary, an LSD test was used to determine differences between treatment means.

Results and discussion

Full blooming dates (50% of flowers completely open) and harvest dates (commercial ripening stage) were recorded for all cultivars in the experimental fields, and average values from 2004 and 2005 are presented in Table 2. The latest cultivar to bloom was ‘Marvin’, which is the cultivar with more chilling requirements (1001 chill units, Albuquerque *et al.*, 2008). On the contrary, ‘Cristobalina’ had the lowest chilling requirements among the studied cultivars (397 chill units, Albuquerque *et al.*, 2008) and it flowered at middle March. However, harvest time was not related to blooming time, since it varied from middle April for the earlier cultivar ‘Cristobalina’, which was the earliest cultivar to flower, to middle-late May for ‘Somerset and ‘New Star’, whereas the later cultivar to flower (‘Marvin’) was harvested at early May.

Flower bud density

Flower bud density was not significantly different between cultivars (Table 3 and Fig. 1), suggesting that the flower bud density is not a genotype-dependent factor in sweet cherry. However a clear influence of genotype on flower bud production has been observed in peach and nectarine (Okie and Werner, 1996) as well as in some apricot cultivars (Albuquerque *et al.*, 2004; Ruiz and Egea, 2008).

Flower bud production was different among years. Contrary, flower bud density within apricot cultivars was not significantly affected by the year (Albuquerque *et al.*, 2004), although the climatic conditions were very different between years. The influence of the year observed in sweet cherry could be due to the fact that sweet cherry is more sensitive to temperature profiles during flower bud induction than other fruit *species*. Furthermore, the effect of the year on flower bud density was different for each variety,



with the exception of 'Brooks', 'Burlat' and 'New Star'. Flower bud density of 'Marvin' was smaller in 2004 than in others years. For 'Cristobalina', 'Ruby' and 'Somerset' the higher flower bud production was observed in 2006. These results indicate that the effect of year on flower bud density is more accused in some cultivars than others.

Number of flower buds per node and flower buds drop

The year and the cultivar significantly affected the number of flower buds per node (Table 3). The cultivars 'Brooks', 'Cristobalina', 'Marvin' and 'Ruby' showed the highest production of flower buds per node in the different years and for most of the cultivars this production was slightly high in 2006 (Fig. 2). Accordingly, Iezzoni and Mulinix (1992) found a high variability in the number of flower buds per node when they studied a sour cherry seedling collection.

Flower buds drop percentage was no different between cultivars, but a strong influence of the year was observed (Table 3). The highest percentages of bud drop were observed in 2004 and 2005 (Fig. 2). The interaction between cultivars and years was very significant, which is due to the different values of flower bud drop for each cultivar in different years. Flower bud abscission ranged between 0% ('Burlat' in 2007) and 31.82% ('New Star' in 2006) (Fig 2). Percentages of flower buds drop of sweet cherry cultivars recorded in this work are much lower than those observed in several apricot cultivars (Albuquerque *et al.*, 2004; Martínez-Gómez *et al.*, 2002; Ruiz and Egea, 2008), although there is not available information about flower buds drop in others sweet cherry cultivars for comparative purposes.

Total number of flowers per node and fruit set

The statistical analysis of data indicates that cultivar and year had a strong influence on the total number of flowers per node (Table 3). In all cultivars the highest production of flowers per node was observed in 2006, with five cultivars ('Ruby', 'Brooks', 'Marvin', 'Cristobalina' and 'Somerset') having more than 15 flowers per node in this year (Fig. 3).

Fruit set percentages were also strongly influenced by cultivar and year (Table 3), being 'New Star' and 'Cristobalina' the cultivars with the highest fruit set in 2005, 2006 and 2007 (over 30 %) (Fig. 3). In addition, there was a strong influence of the interaction cultivar and year on fruit set. Percentages in all cultivars with the exception of 'Cristobalina' and 'Somerset' varied with the year. However, a slightly increase of fruit set percentages was recorded in 2006 in many of the cultivars.

Many studies have examined the influence of climatic conditions at flowering on fruit set with detrimental effect of both, low and high temperatures. Thus, it is known that cold temperatures at flowering reduce the rate of pollen tube growth and may shorten the effective pollination period (Sanzol and Herrero, 2001), while a negative effect of high



pre-blossom temperatures (≥ 27 °C) on ovule longevity and pollination effectiveness was pointed out by Caprio and Quamme (1998) as causing poor production in apple. The effect of high temperatures during flowering on pollen and pistil functions has been evaluated in detail in sweet cherry. Thus, Postweiler *et al.* (1985) described a negative effect of high temperatures on ovule viability. The duration of stigma receptivity was reduced at temperatures higher than 10 °C (20 and 30 °C) and pollen germination was also negatively affected at these temperatures (Hedhly *et al.*, 2003). Hedhly *et al.* (2004) studied the pollen tube dynamic in two sweet cherry cultivars founding a differential genotypic response to temperature, since high temperature (30 °C) increased the number of pollen tubes at the base of the style in ‘Cristobalina’ but it was reduced in ‘Sunburst’, which is adapted to a cooler climate. These results suggest that temperature during flowering could be a selective agent influencing positively pollen tube growth in those genotypes better adapted to warm climatic conditions. The high fruit production observed in ‘Cristobalina’ could reflect its adaptation to Mediterranean climatic conditions. However, the Canadian cultivar ‘New Star’ with high chilling requirements (909 chill units, Alburquerque *et al.*, 2008) had very high fruit set percentages. Therefore, differences in fruit production observed between ‘New Star’, ‘Cristobalina’ and the rest of cultivars could be due to their self compatibility status.

The year-to-year variation and differences among cultivars seem to indicate that there is a strong influence of climatic conditions and genotype on sweet cherry fruit set, as has been found in other studies (Choi and Andersen, 2001) and in different fruit species such as pear (Atkinson and Taylor, 1994; Atkinson and Lucas, 1996) or apricot (Alburquerque *et al.*, 2004; Ruiz and Egea, 2008).

Double fruits and cracking sensitivity

The percentages of double fruits were different between cultivars but not between years when averages of all cultivars are compared (Table 3). However, the interaction between cultivars and years was significant (Table 3), which means that the effect of the year on the double fruits production was different for some cultivars.

In ‘Satohnishiki’ sweet cherry cultivar double fruit production has been related to high temperatures during summer, when the sepal and petal differentiation occurs (Beppu *et al.*, 2001). Under our climatic conditions, summer temperatures do not influence equally the production of double fruits. Thus, the percentage of double fruits in ‘Brooks’ was higher in 2005 (9.8 ± 3.60) than in 2006 (0.7 ± 0.66) or 2007 (0.0 ± 0.00). However, the highest double fruit production of ‘Somerset’ was observed in 2007 (41.85 ± 12.77).

The cultivars that consistently produced lower amount of double fruits were ‘Marvin’ and ‘New Star’ (Fig. 4). Thus, our results seem to indicate that double fruit production has a strong genetic influence, accordingly with Roversi *et al.* (2008).



Caprio and Quamme (2006) found that rainfall during fruit development and harvest of sweet cherry reduced production because of rain-induced cracking. However, no cracking sensitivity was observed in the studied sweet cherry cultivars under our climatic conditions, probably due to scarce rainfall during maturity fruit period.

Fruit quality parameters

It is known that environmental factors and orchard management (choice of rootstock, pruning, fertilisation and irrigation) affect cherry fruit quality, in terms of different concentration of nutritive and bioactive compounds (Predieri *et al.*, 2004; Gonçalves *et al.*, 2006). However, in this work all cherry cultivars were in very close farms, under similar cultural practices. Trees were of the same age and grafted onto the same rootstock. Therefore, differences in quality parameters between cultivars that will be commented below should be attributed to genetic characteristics of each cultivar.

Fruit weight was very different between cultivars and stages (Table 3). 'New Star' showed the largest fruit in all stages, whereas 'Cristobalina' had the smallest fruits (Fig. 5). At the commercial stage (S4) the values were 12.70 ± 0.54 g for 'New Star' and 7.26 ± 0.30 g for 'Cristobalina'.

In sweet cherry, the ripening process is characterized by colour changes, from green to red, which can be followed by the evolution of L^* , a^* and b^* parameters and the colour indices Chroma and Hue. The colour index (a^*/b^*) has been proposed as a good colour index for sweet cherry cultivars (Díaz-Mula *et al.*, 2009), since it shows a continuous increase during fruit ripening on the tree and has been used in other species such as apple, pear and peach. In accordance our results show an increase from S1 to S4 in all the studied cultivars in this paper (Fig. 5), although important differences were found between them (Table 3). Thus, the highest value at S4 stage was found for 'Marvin' (4.31 ± 0.18) and the lowest for 'New Star' (2.95 ± 0.13), showing the darkest red and the lightest red colour, respectively. Moreover, taking into account the relationship between a^*/b^* index and total anthocyanin concentration in sweet cherry cultivars (Díaz-Mula *et al.*, 2009), great variations between cultivars would exist in anthocyanin concentration leading to differences in antioxidant activity and health beneficial effects (Scalbert *et al.*, 2005; Díaz-Mula *et al.*, 2009; Serrano *et al.*, 2009).

Total soluble solids increased from S1 to S4 in all sweet cherry cultivars, with values at S4 ranging from ≈ 12 °Brix in 'Burlat' to ≈ 20.5 °Brix in the cultivars 'Brooks' and 'Ruby' respectively (Fig. 6). In general, these cultivars have high content of total soluble solids, since in other sweet cherry cultivars, harvested at commercial ripening stage, values between 11 and 25 °Brix have been reported (Girard and Kopp, 1998; Esti *et al.*, 2002; Serrano *et al.*, 2005a and b). The main sugars found in cherry cultivars have been glucose and fructose, followed by sorbitol and sucrose (Girard and Kopp, 1998; Serrano *et al.*,



2005a; Usenik *et al.*, 2008). Important differences were also found in total acidity among sweet cherry cultivars (Table 3). Thus, the highest values were found in ‘Somerset’, ($\approx 1.6 \text{ g x } 100 \text{ g}^{-1}$) followed by ‘New Star’ ($\approx 1.3 \text{ g x } 100 \text{ g}^{-1}$) and the remaining cultivars showed values of $0.6\text{-}0.7 \text{ g x } 100 \text{ g}^{-1}$ (Fig. 6). However, in stone fruits other than cherries, such as nectarines (Iglesias and Echevarría, 2009) and peach (Byrne *et al.*, 1991) acidity decreased over the development and ripening, while an accumulation was observed but not in all cultivar tested, in agreement with the reported increase in total acidity as harvesting date was delayed in ‘Lapins’ and ‘4-70’, also called ‘Marvin’, cherries (Drake and Elfving, 2002; Serrano *et al.*, 2005a). Nevertheless, for sweet cherry the ratio soluble solids/total acidity has been proposed as determining consumer acceptance (Crisosto *et al.*, 2003). This ratio increased along the ripening process on tree (from S1 to S4) in all sweet cherry cultivars, with the highest values being reached in ‘Brooks’, ‘Marvin’ and ‘Ruby’ cultivars and the lowest in ‘New Star’ and ‘Somerset’ (Fig. 6).

Fruit firmness is also an attribute very appreciated by consumers although there are considerable genotypic differences (Table 3), as can be observed in Fig. 7, with firmness levels at S4 ranging from $\approx 1 \text{ N x mm}^{-1}$ in ‘Cristobalina’ to $\approx 3.20 \text{ N x mm}^{-1}$ in ‘Brooks’. Softening in the last days of ripening of sweet cherry has been attributed to increases in β -galactosidase activity, unlike in most of fruits, in which softening is dependent on pectin depolymerization due to polygalacturonase activity (Gerardi *et al.*, 2001; Batisse *et al.*, 1996).

References

- ALBURQUERQUE N., BURGOS L., EGEA J., 2004. Influence of flower bud density, flower bud drop and fruit set on apricot productivity. *Sci Hortic -Amsterdam* 102, 397-406.
- ALBURQUERQUE N., GARCÍA-MONTIEL F., CARRILLO A., BURGOS L., 2008. Chilling and heat requirements of sweet cherry cultivars and the relationship between altitude and the probability of satisfying the chill requirements. *Environ Exp Bot* 64, 162-170.
- ATKINSON C.J., LUCAS A.S., 1996. The response of flowering date and cropping of *Pyrus communis* cv Concorde to autumn warming. *J Hortic Sci* 71, 427-434.
- ATKINSON C.J., TAYLOR L., 1994. The influence of autumn temperature on flowering time and cropping of *Pyrus communis* cv conference. *J Hortic Sci* 69, 1067-1075.
- BAGGIOLINI M., 1952. Stade repères du pecher. *Rev. Rom. d'Agric., Vit. Arbor.* 4, 29.
- BATISSE, C., BURET, M., COULOMB, P. J., 1996. Biochemical differences in cell wall of cherry fruit between soft and crisp fruit. *J. Agric. Food Chem.* 44, 453-457.
- BELLINI E., GIANELLI G., 1975. Sul valore tassonomico di alcuni caratteri del ramo nel pesco. *Riv Ortoflorofruitt It* 59, 440-458.



- BEPPU K., IKEDA T., KATAOKA I., 2001. Effect of high temperature exposure time during flower bud formation on the occurrence of double pistils in 'Satohnishiki' sweet cherry. *Sci Hortic -Amsterdam* 87, 77-84.
- BYRNE D.H., NIKOLIC A.N., BURNS E.E. 1991. Variability in sugars, acids, firmness and colour characteristics of 12 peach genotypes. *J Am Soc Hort Sci*, 116, 1004-1006.
- BURGOS L., EGEA J., 1993. Apricot embryo-sac development in relation to fruit set. *J Hort Sci* 68, 203-208.
- CAPRIO J.M., QUAMME H.A., 1998. Weather conditions associated with apple production in the Okanagan Valley of British Columbia. *Can J Plant Sci* 79, 129-137.
- CAPRIO J.M. QUAMME H.A., 2006. Influence of weather on apricot, peach and sweet cherry production in the Okanagan Valley of British Columbia. *Can. J Plant Sci* 86, 259-267.
- CHOI C., ANDERSEN R., 2001. Variable fruit set in self-fertile sweet cherry. *Can J Plant Sci* 81, 753-760.
- CRISOSTO C. H.; CRISOSTO G. M.; METHENEY P., 2003. Consumer acceptance of 'Brooks' and 'Bing' cherries is mainly dependent on fruit SSC and visual skin color. *Postharvest Biol Technol* 28, 159-167.
- DÍAZ-MULA H.M., CASTILLO S., MARTÍNEZ-ROMERO D., VALERO D., ZAPATA P.J., GUILLÉN F., SERRANO M., 2009. Organoleptic, nutritive and functional properties of sweet cherry as affected by cultivar and ripening stage. *Food Sci Tech Int* 15: 534-535.
- DRAKE S. R., ELFVING D. C., 2002. Indicators of maturity and storage quality of 'Lapins' sweet cherry. *HortTech* 12, 687-690.
- ESTI M., CINQUANTE L., SINESIO F., MONETA E., MATTEO M., 2002. Physicochemical and sensory fruit characteristic of two sweet cherry cultivars after cool storage. *Food Chem* 76, 399-405.
- FURUKAWA Y., BUKOVAC M.J., 1989. Embryo sac development in sour cherry during the pollination period as related to fruit set. *HortSci* 24, 1005-1008.
- GERARDI C., BLANDO F., SANTINO A., ZACHEO G., 2001. Purification and characterisation of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *Plant Sci* 16, 795-805.
- GIRARD B., KOPP T. G., 1998. Physicochemical characteristics of selected sweet cherry cultivars. *J Agr Food Chem* 46, 471-476.
- GONÇALVES B., MOUTINHO-PEREIRA J., SANTOS A., SILVA A.P., BARCELAR E., CORREIRA C., ROSA E., 2006. Scion-rootstock interaction affects the physiology and fruit quality of sweet cherry. *Tree Physiol* 26, 93-104.
- GUERRIERO R., VITI R., BARTOLINI S., 1985. Winter changes in the appearance of flower cup anomalies in an italian late blooming variety. *Acta Hort* 192, 49-56.



- GUITIAN J., 1993. Why *Prunus mahaleb* (Rosaceae) produces more flowers than fruits. *Am J Bot* 80, 1305-1309.
- HEDHLY A., HORMAZA J.I., HERRERO M., 2003. The effect of temperature on stigmatic receptivity in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Cell Env* 26, 1673-1680.
- HEDHLY A., HORMAZA J.I., HERRERA M., 2004. Effect of temperature on pollen tube kinetics and dynamics in sweet cherry, *Prunus avium* (Rosaceae). *Am J Bot* 91, 558-564.
- IEZZONI A.F., MULINIX C.A., 1992. Yield components among sour cherry seedlings. *J Am Soc Hortic Sci* 117, 380-383.
- IGLESIAS I., ECHEVERRIA G., 2009. Differential effect of cultivar and harvest date on nectarine colour, quality and consumer acceptance. *Sci Hortic -Amsterdam* 102, 41-50.
- LEGAVE J.M., 1975. La diferenciación del bourgeon a fleur et le repos hivernal chez l'abricotier (*Prunus Armeniaca Vulgaris*). *La Pomologie Francaise* 17, 150-168.
- LEGAVE J.M., GARCÍA G., MARCO F., 1982. Some descriptive aspects of drops process of flower buds, or young flowers observed on apricot tree in south of France. *Acta Hort* 121, 75-83.
- MAPYA, 2008. Anuario de estadística. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. <http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/introduccion.htm>
- MARTÍNEZ-GÓMEZ P., DICENTA F., RUIZ D., EGEA J., 2002. Flower bud abscission in apricot: competition between vegetative and flower buds, and effects of early defoliation and high pre-blossom temperatures. *J Hortic Sci & Biotec* 77, 485-488.
- MUSKOVICS G., FELFÖLDI J., KOVÁCS E., PERLAKI R., KÁLLAY T., 2006. Changes in physical properties during fruit ripening of Hungarian sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Postharvest Biol Tech* 40, 56-63.
- OKIE W.R., WERNER D.J., 1996. Genetic influence on flower bud density in peach and nectarine exceeds that of environment. *HortScience* 31, 1010-1012.
- PREDIERI S., DRIS R., RAPPARINI F., 2004. Influence of growing conditions on yield and quality of cherry: II. Fruit quality. *Food Agric Env* 2, 307-309.
- POSTWEILER K., STÖSSER R., ANVARI S.F., 1985. The effect of different temperatures on the viability of ovules in cherries. *Sci Hortic -Amsterdam* 25, 235-239.
- RICHARDSON E.A., SEELEY S.D., WALKER D.R., 1974. A model for estimating the completion of rest for 'Redhaven' and 'Elberta' peach trees. *HortScience* 1, 331-332.
- ROMANO G.S., CITTADINI E.D., PUGH B., SCHOUTEN R., 2006. Sweet cherry quality in the horticultural production chain. *Stewart Postharvest Rev* 6, 2.
- ROVERSI A., FAJT N., MONTEFORTE A., FOLINI L., PANELLI, D., 2008. Observations on the Occurrence of Sweet Cherry Double-Fruits in Italy and Slovenia. *Acta Hort* 795, 849-854



- RUIZ D., EGEEA J., 2008. Analysis of the variability and correlations of floral biology factors affecting fruit set in apricot in a Mediterranean climate. *Sci Horti -Amsterdam* 115, 154-163.
- SANZOL J., HERRERO M., 2001. The "effective pollination period" in fruit trees. *Sci Horti -Amsterdam* 90, 1-17
- SCALBERT A., MANACH C., MORAND C., RÉMÉSY C., JIMÉNEZ L., 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Rev Food Sci Nutrition* 45, 287-306.
- SERRANO M., DÍAZ-MULA H.M., ZAPATA P.J., CASTILLO S., GUILLÉN F., MARTÍNEZ-ROMERO D., VALVERDE J.M., VALERO D., 2009. Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars. *J Agr Food Chem* 57, 3240-3246.
- SERRANO M., GUILLÉN F., MARTINEZ-ROMERO D., CASTILLO S., VALERO D., 2005a. Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *J Agr Food Chem* 53, 2741-2745.
- SERRANO M., MARTÍNEZ-ROMERO D., CASTILLO C., GUILLÉN F., VALERO D., 2005b. The use of natural antifungal compounds improves the beneficial effect of MAP in sweet cherry storage. *Inn Food Sci Emerging Tech* 6, 115– 123.
- USENIK V., FABČIČ J., STĀMPAR F., 2008. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem* 107, 185–192.



Table 1. Average maximum and minimum temperatures (°C), rainfall and chill units calculated with Utha method (Richardson *et al.* 1974) in Jumilla and Abarán (Murcia) during four consecutive years

	Maximum temperature (°C)	Minimum temperature (°C)	Rainfall (mm)	Chill Units
Jumilla				
2004	25.7	8.4	286.0	1025.0
2005	26.2	5.9	88.4	1208.0
2006	26.7	6.3	207.3	1247.5
2007	25.5	7.5	292.8	1107.5
Abarán				
2004	27.9	10.5	256.9	678.0
2005	26.7	8.3	186.2	1132.5
2006	27.2	8.3	245.0	1004.5
2007	26.1	10.5	288.7	779.0

Table 2. Full blooming dates (50% of flowers completely open) and harvest dates (commercial ripening stage, S4). Data are average from two consecutive years (2004-2005) for blooming and harvest days.

Cultivar	Blooming date	Harvest date
'Cristobalina'	March 14 th	April 18 th
'Brooks'	March 27 th	May 12 th
'Ruby'	March 29 th	May 10 th
'Somerset'	April 3 rd	May 20 th
'Burlat'	April 4 th	May 3 th
'New Star'	April 4 th	May 17 th
'Marvin'	April 9 th	May 7 th



Table 3. P values obtained in the ANOVA for different flowering and fruits quality parameters in seven sweet cherry cultivars grown in southeast of Spain recorded in four consecutive years (2004-2007).

Source of variation	Degrees of freedom	P
<i>Flower bud density</i>		
Year	3	0.0001
Cultivar	6	0.2714
Year x Cultivar	14	0.0107
Error	120	
<i>Number of flower buds/ node</i>		
Year	3	0.0001
Cultivar	6	0.0001
Year x Cultivar	14	0.0001
Error	902	
<i>Flower buds drop</i>		
Year	3	0.0057
Cultivar	6	0.0890
Year x Cultivar	14	0.0001
Error	117	
<i>Total number of flower/ node</i>		
Year	3	0.0001
Cultivar	6	0.0001
Year x Cultivar	14	0.0001
Error	902	
<i>Fruit set</i>		
Year	2	0.0001
Cultivar	8	0.0001
Year x Cultivar	14	0.0006
Error	120	
<i>Double fruits</i>		
Year	2	0.2845
Cultivar	5	0.0001
Year x Cultivar	10	0.0161
Error	134	
<i>Fruit weight</i>		
Stage	3	0.0001
Cultivar	6	0.0001
Stage x Cultivar	18	0.0001
Error	160	
<i>Color index</i>		
Stage	3	0.0001
Cultivar	6	0.0001
Stage x Cultivar	18	0.0001
Error	57	
<i>Soluble solids</i>		
Stage	3	0.0001
Cultivar	6	0.0001
Stage x Cultivar	18	0.0001
Error	104	
<i>Total acidity</i>		
Stage	3	0.0001
Cultivar	6	0.0001
Stage x Cultivar	18	0.0001
Error	104	
<i>Ripening index</i>		
Stage	3	0.0001
Cultivar	6	0.0001
Stage x Cultivar	18	0.0001
Error	104	
<i>Fruit firmness</i>		
Stage	3	0.0001
Cultivar	6	0.0001
Stage x Cultivar	18	0.0001
Error	288	

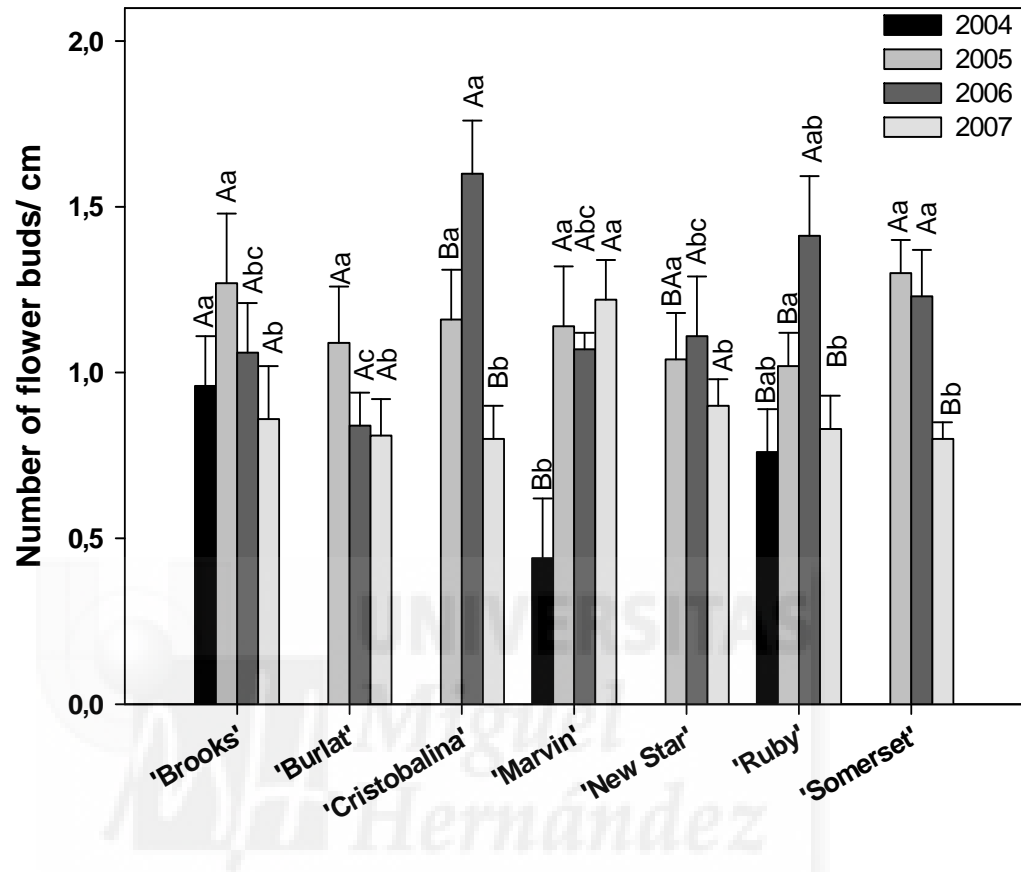


Figure 1. Flower bud density (number of flower buds/cm) found in seven sweet cherry cultivars from 2004 to 2007. Data are average \pm S.E. Different capital letters represent differences between years for the same cultivar and lower-case letters represent differences between cultivars within the same year at 0.05 probability level (LSD test).

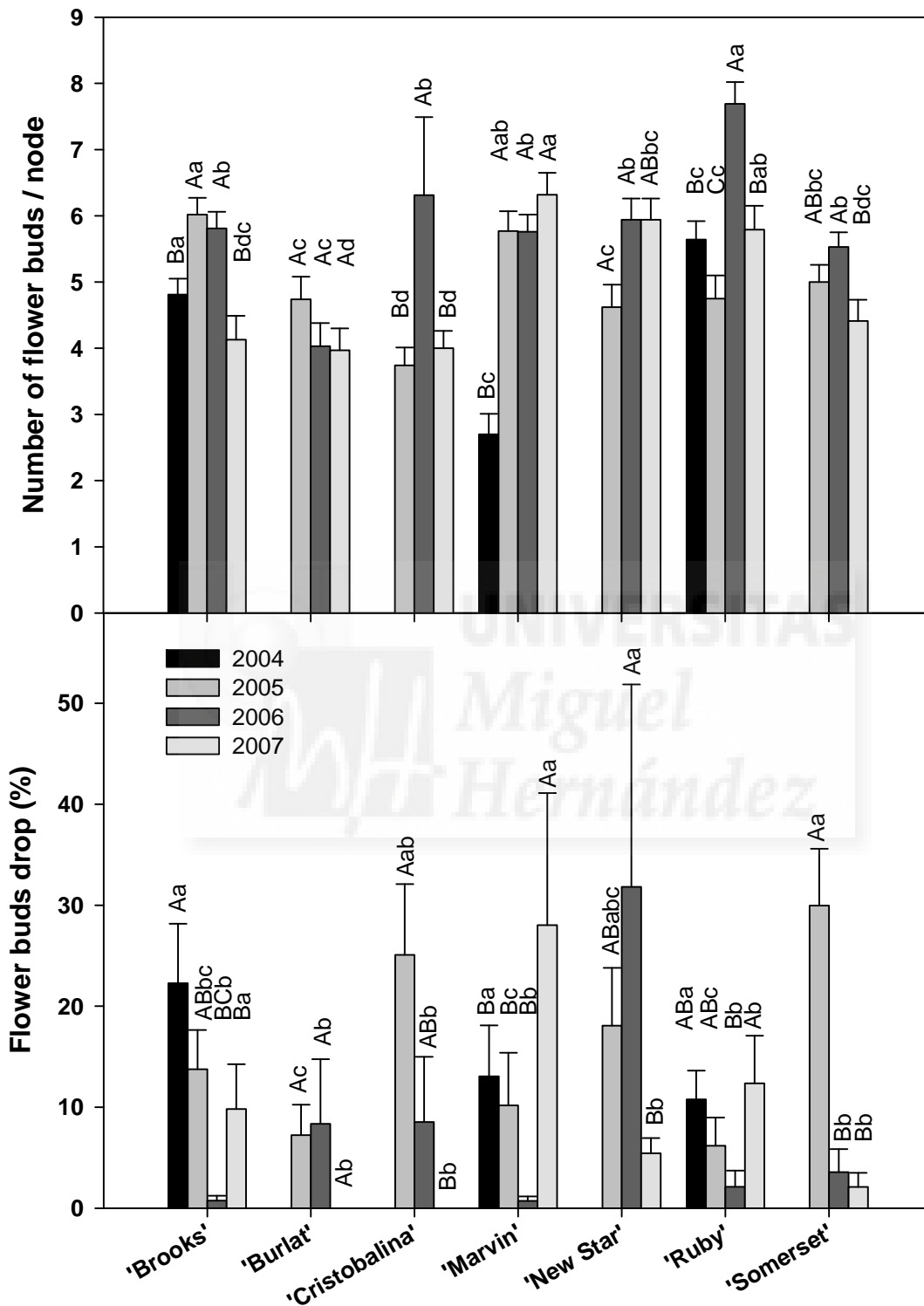


Figure 2. Number of flower buds per node and percentage of flower buds drop found in seven sweet cherry cultivars from 2004 to 2007. Different capital letters represent differences between years for the same cultivar and lower-case letters represent differences between cultivars within the same year at 0.05 probability level (LSD test)

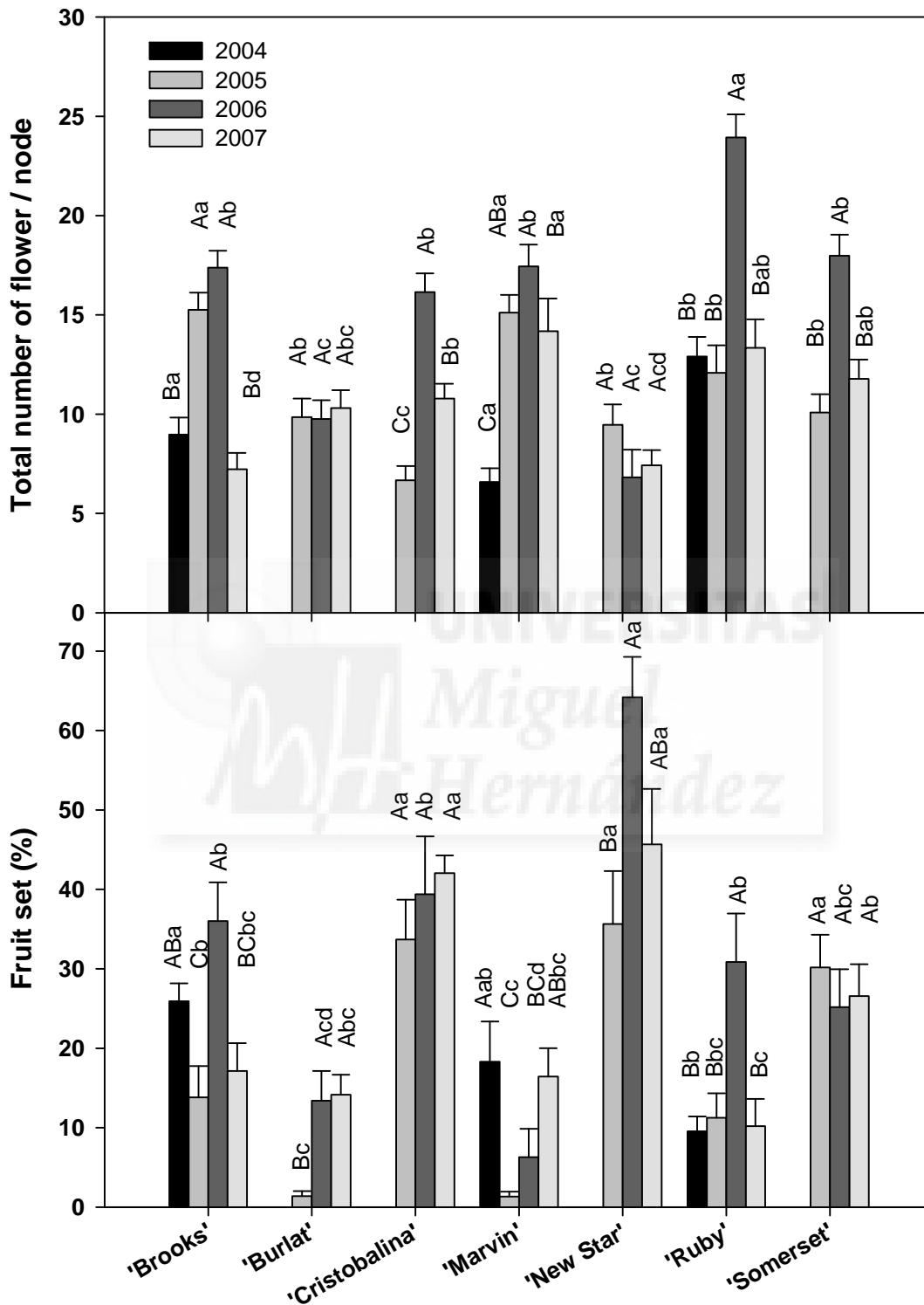


Figure 3. Total number of flowers per node and fruit set (%) found in seven sweet cherry cultivars from 2004 to 2007. Different capital letters represent differences between years for the same cultivar and lower-case letters represent differences between cultivars within the same year at 0.05 probability level (LSD test)

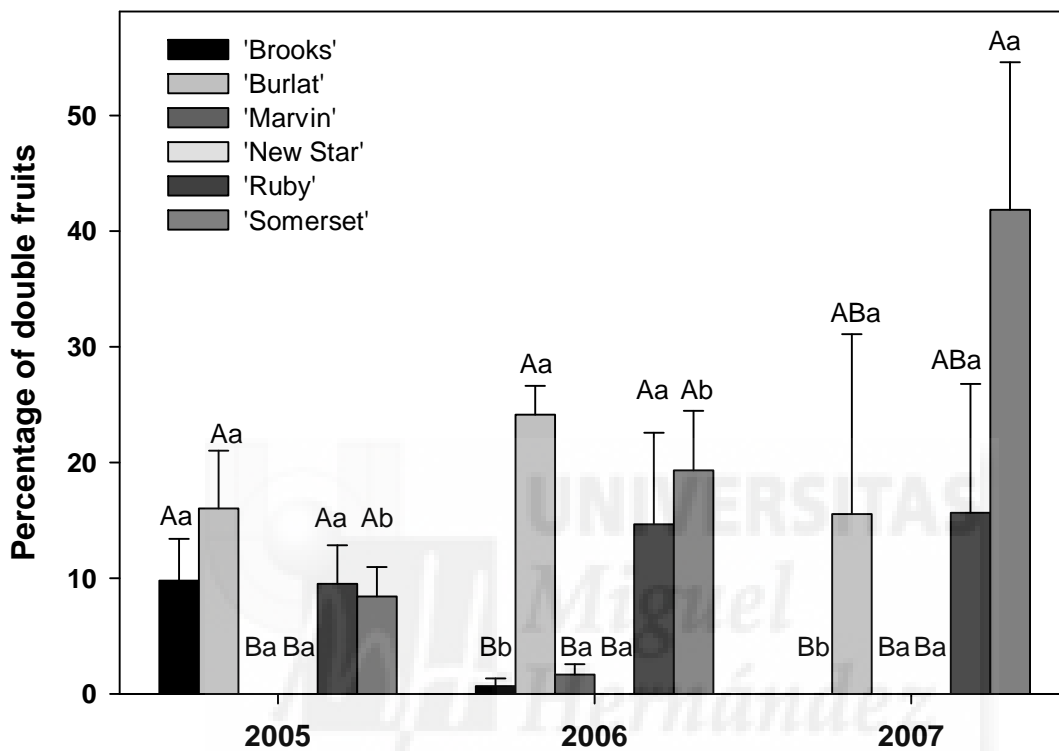


Figure 4. Percentages of double fruits observed in six sweet cherry cultivars calculated at Jumilla (Murcia) from 2005 to 2007. Different capital letters represent differences between cultivars for the same year and lower-case letters represent differences between years within the same cultivar at 0.05 probability level (LSD test)

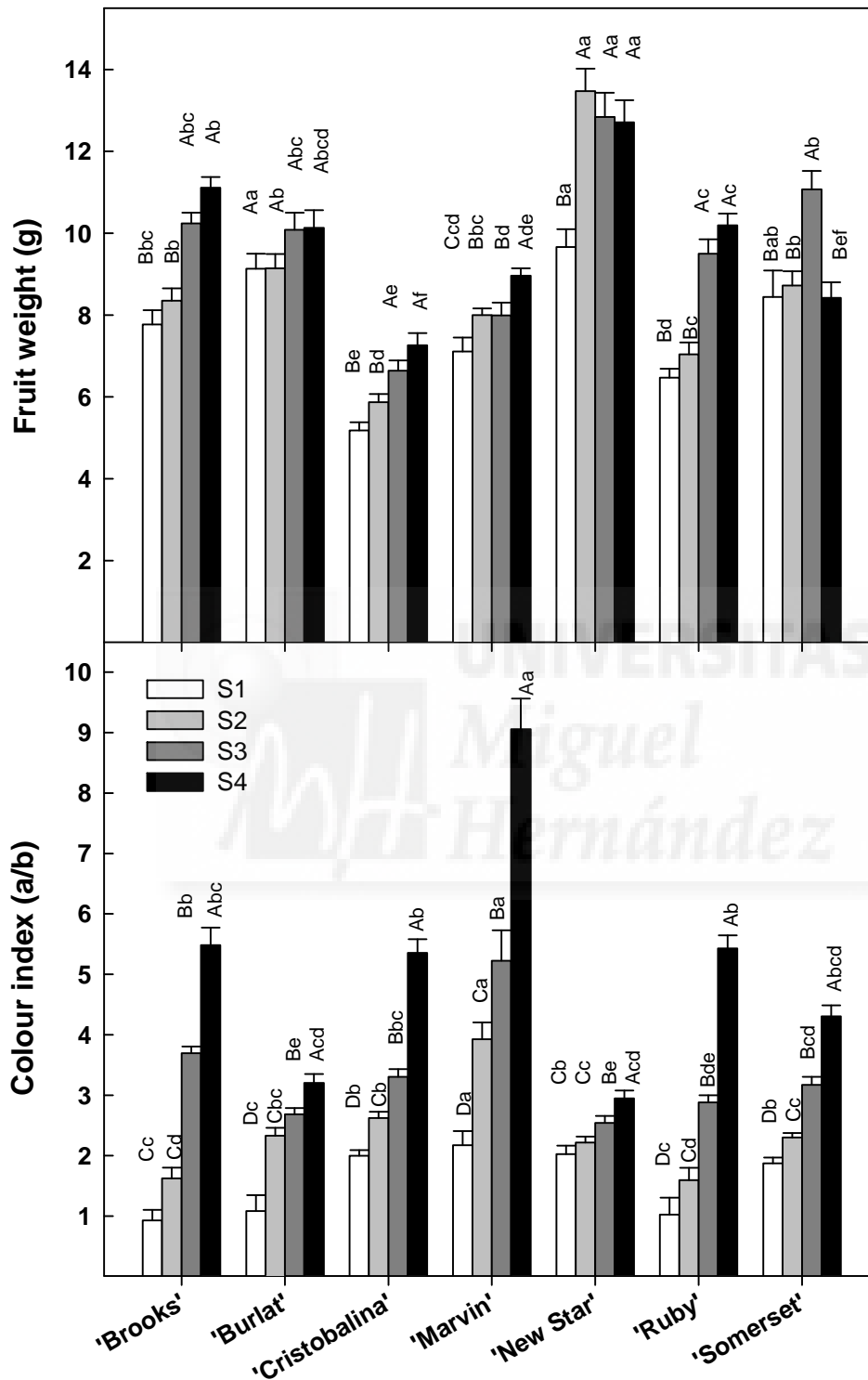


Figure 5. Fruit weight and colour index (a/b) evolution from S1 to S4 in seven sweet cherry cultivars. Data are average \pm S.E. Different capital letters represent differences between stages for the same cultivar and lower-case letters represent differences between cultivars within the same stage at 0.05 probability level (LSD test).

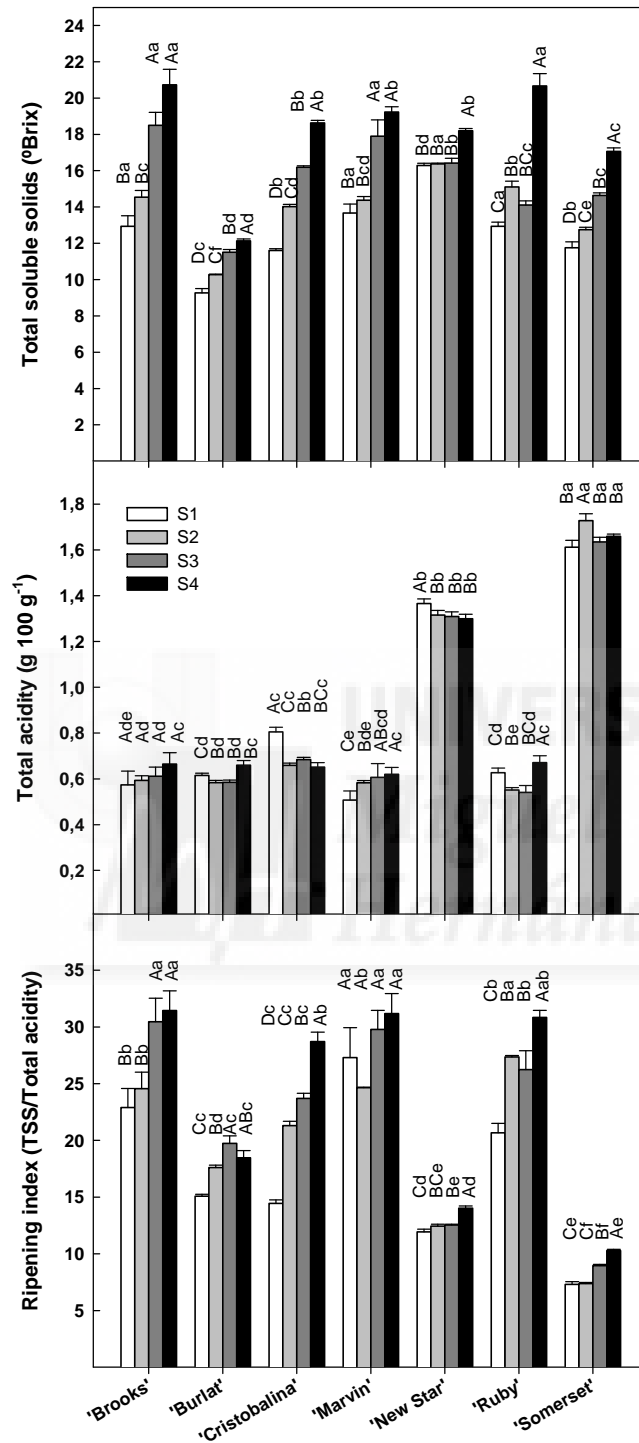


Figure 6. Total soluble solids, total acidity and ripening index evolution from S1 to S4 in seven sweet cherry cultivars. Data are average \pm S.E. Different capital letters represent differences between stages for the same cultivar and lower-case letters represent differences between cultivars within the same stage at 0.05 probability level (LSD test).

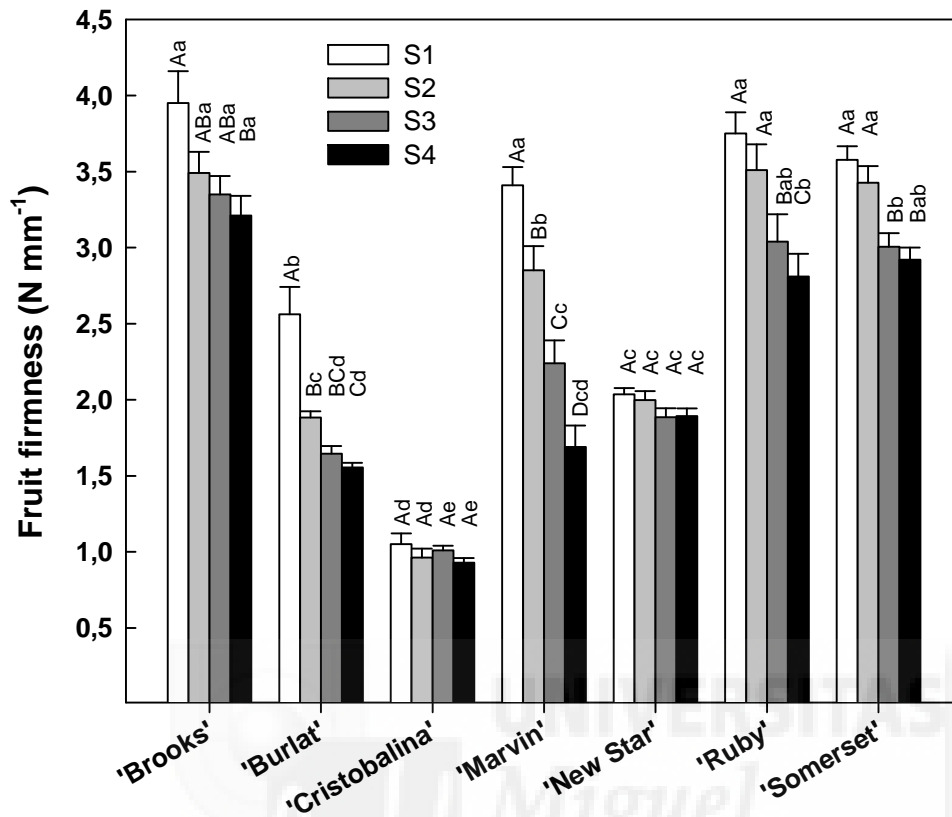


Figure 7. Fruit firmness evolution from S1 to S4 in seven sweet cherry cultivars. Data are average \pm S.E. Different capital letters represent differences between stages for the same cultivar and lower-case letters represent differences between cultivars within the same stage at 0.05 probability level (LSD test).

