

Relationships between stomatal and gas exchange characteristics of the leaf blade in 'Colín V-33' avocado seedlings

Relaciones entre características estomáticas y de intercambio de gases de la lámina foliar en plántulas de semilla de aguacate 'Colín V-33'

Nora Virginia Useche-Carrillo; Juan Ayala-Arreola;
Eduardo Campos-Rojas; Alejandro Facundo Barrientos-Priego*

Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia. Carretera México-
Texcoco km 38.5, Texcoco, Estado de México, C. P. 56230, MÉXICO.

*Corresponding author: abarrientosp@chapingo.mx, tel. +52 5959521500 ext. 6413.

Abstract

The use of avocado rootstocks is very common, but these have been little studied from the anatomical and physiological point of view of the leaf, variables that can be useful to understand their role when grafted, such as those related to stomata and gas exchange. The aim of this research was to study the stomatal and gas exchange characteristics of the leaf blade in seedlings derived from 'Colín V-33' avocado seed to determine possible relationships between them. Ninety-three six-month-old 'Colín V-33' seed-derived plants were used. Four stomatal and five gas exchange variables were evaluated in the eleventh leaf of each plant. Stomata were classified as anomocytic, and their length ranged from 13.11 to 19.65 μm , their density varied from 317.65 to 105.88 stomata- mm^{-2} and their stomatal index was from 11.78 to 26.16 %. A significant positive correlation was found between the physiological variables stomatal conductance and transpiration rate ($r = 0.96^{**}$), while the CO_2 assimilation rate and internal CO_2 concentration were negatively correlated ($r = -0.64^{**}$). No association was found between gas exchange characteristics and stomata-related variables. Due to the variation found in stomatal density and stomatal index, it is possible to select contrasting genotypes that could have an impact on grafting when used as rootstocks, given the evidence from other studies where there are modifications in these variables.

Keywords: *Persea americana* Mill., gas exchange, stomatal index, stomatal density, stomatal conductance, transpiration.

Resumen

El uso de portainjertos de aguacate es muy común, pero éstos han sido poco estudiados desde el punto de vista anatómico y fisiológico de la hoja, variables que pueden ser útiles para entender su papel al ser injertados, como las relacionadas con los estomas y el intercambio de gases. El objetivo de esta investigación fue estudiar las características de los estomas e intercambio de gases de la lámina foliar en plántulas derivadas de semilla de aguacate 'Colín V-33' para determinar posibles relaciones entre estas. Se utilizaron 93 plantas derivadas de semilla de 'Colín V-33' de seis meses de edad. Se evaluaron cuatro variables de estomas y cinco de intercambio de gases en la hoja once de cada planta. Los estomas se clasificaron como anomocíticos, y su longitud fue de 13.11 a 19.65 μm , su densidad varió de 317.65 a 105.88 estomas- mm^{-2} y su índice estomático fue de 11.78 a 26.16 %. Se encontró correlación positiva significativa entre las variables fisiológicas conductancia estomática y tasa de transpiración ($r = 0.96^{**}$), mientras que en la tasa de asimilación de CO_2 y la concentración interna de CO_2 existió una correlación negativa ($r = -0.64^{**}$). No se encontró asociación entre las características de intercambio de gases y las variables relacionadas con estomas. Debido a la variación encontrada en la densidad y el índice estomático, es posible seleccionar genotipos contrastantes que podrían tener impacto en el injerto cuando sean utilizados como portainjertos, dada la evidencia de otros estudios donde hay modificaciones en dichas variables.

Palabras clave: *Persea americana* Mill., intercambio gaseoso, índice estomático, densidad estomática, conductancia estomática, transpiración.



Introduction

Avocado production in Mexico is based on the use of vigorous rootstocks that generate trees that make agronomic management difficult due to their size. For this reason, several research projects are focused on finding dwarf cultivars that are productive and have good fruit quality, in order to establish high-density plantations and reduce production costs (Sánchez-Colín, Rubí-Arriaga, & de la Cruz-Torres, 1992).

Currently, in breeding programs, the physiological efficiency of new avocado cultivars is important, which can be related to leaf efficiency, for example, water-use efficiency (Acosta-Rangel et al., 2018), when considering that it responds to soil conditions such as root hypoxia (Gil, Gurovich, Schaffer, García, & Iturriaga, 2009), and salinity (Acosta-Rangel et al., 2019), among other factors. In addition, unlike roots that require digging or the use of rhizotrons to obtain and study them, direct access is available with leaves.

The primary processes that determine plant growth are, fundamentally, those involving gas exchange with the surrounding air, such as photosynthesis, respiration and transpiration (Taiz & Zeiger, 2006), and they occur mainly in leaves. Within the epidermal tissue of the leaf are the stomata, formed by an ostiole or pore surrounded by two kidney-shaped occlusive cells (called guard cells), and may be accompanied by cells called subsidiary or support cells (Prabhakar, 2004).

The presence of stomata on the upper and lower sides of the leaf blade are distinctive characteristics among species, which are classified as amphistomatic (which have stomata on both surfaces), hypostomatic (with stomata on the abaxial or lower surface) and epistomatic (with stomata on the adaxial or upper surface) (Fricker & Willmer, 2012). The distribution of stomata in avocado leaves has been classified as hypostomatic (Kofidis, Bosabalidis, & Chartzoulakis, 2004).

Gas exchange is mainly carried out by stomata, where gas conductance is controlled by changes in the turgor of the guard cells and responds to various environmental factors, including light, humidity, and CO₂ concentration (Assmann & Gershenson, 1991). The relationship between CO₂ assimilation and stomatal conductance varies among species, and may be absent, resulting in internal CO₂ accumulation (Gil et al., 2009).

The number of stomata in plant species is highly variable. Fricker and Willmer (2012) observed a variation from 14 to 2,200 stomata·mm⁻² and found that the frequency is affected by a number of factors. Some researchers found, in various citrus and *Annona* species, that the number of stomata on the leaf varies with

Introducción

La producción de aguacate en México está basada en el uso de portainjertos vigorosos que generan árboles que llegan a dificultar el manejo agronómico por su tamaño. Por ello, diversas investigaciones se enfocan en encontrar cultivares enanos que sean productivos y con buena calidad de fruta, con el fin de establecer plantaciones en alta densidad y reducir costos de producción (Sánchez-Colín, Rubí-Arriaga, & de la Cruz-Torres, 1992).

Actualmente, en los programas de mejoramiento genético, es importante la eficiencia fisiológica de nuevos cultivares de aguacate, la cual puede estar relacionada con la eficiencia de la hoja; por ejemplo, el uso eficiente del agua (Acosta-Rangel et al., 2018), al considerar que ésta responde a condiciones de suelo como la hipoxia de raíces (Gil, Gurovich, Schaffer, García, & Iturriaga, 2009), y la salinidad (Acosta-Rangel et al., 2019), entre otros. Además, a diferencia de las raíces que requieren excavación o utilizar rizotrones para poder obtenerlas y estudiarlas, con las hojas se tiene acceso directo.

Los procesos primarios que determinan el crecimiento vegetal son, fundamentalmente, los que involucran el intercambio de gases con el aire circundante, como fotosíntesis, respiración y transpiración (Taiz & Zeiger, 2006), y ocurren principalmente en hoja. Entre el tejido epidérmico de la hoja se encuentran los estomas, formados por un ostiolo o poro rodeado de dos células oclusivas (llamadas células guarda) con forma arriñonada, y pueden estar acompañadas de células llamadas subsidiarias o células de apoyo (Prabhakar, 2004).

La presencia de estomas en el haz y el envés de la lámina foliar son características distintivas entre especies, las cuales se clasifican como anfiestomáticas (que cuentan con estomas en sus dos superficies), hipoestomáticas (con estomas en la superficie abaxial o envés) y epiestomáticas o hiperestomáticas (con estomas en la superficie adaxial o haz) (Fricker & Willmer, 2012). La distribución de los estomas en hojas de aguacate se ha clasificado como hipoestomáticas (Kofidis, Bosabalidis, & Chartzoulakis, 2004).

El intercambio gaseoso es realizado principalmente por los estomas, donde la conductancia de gases se controla por cambios en la turgencia de las células oclusivas y responde a diversos factores ambientales, entre los que destacan la luz, la humedad y la concentración de CO₂ (Assmann & Gershenson, 1991). La relación entre la asimilación de CO₂ y la conductancia estomática varía entre especies, y puede no presentarse, lo cual resulta en la acumulación interna de CO₂ (Gil et al., 2009).

El número de estomas entre especies vegetales es muy variable. Fricker y Willmer (2012) observaron una variación de 14 a 2,200 estomas·mm⁻², y detectaron que

respect to the rootstock used (Schoch, Zinsou, & Sibi, 1980; Cañizares, Sanabria, Rodríguez, & Perozo, 2003; Parés-Martínez, Arizaleta, Sanabria, & Brito, 2004), and in avocado it is modified by intergrafting (Ayala-Arreola, Barrientos-Priego, Colinas-León, Sahagún-Castellanos, & Reyes-Alemán, 2010). It has been reported that avocado has from 100 to 610 stomata·mm⁻² in seed-derived plants (Kadman, 1965), and that it can vary with the seedling profile, avocado race (Barrientos-Priego, Borys, Trejo, & López-López, 2003) and genotype (Barrientos-Priego & Sánchez-Colín, 1987).

In avocado, 'Colín V-33', which has low vigor and a sprawling growth habit (Roe, Conradie, & Köhne, 1995), has been used as an intermediate graft to reduce the height of trees of the 'Fuerte' (Barrientos-Priego, López-Jiménez, & Sánchez-Colín, 1987) and 'Hass' varieties (Barrientos-Villaseñor, Barrientos-Priego, Rodríguez-Pérez, Peña-Lomelí, & Muñoz-Pérez, 1999). Likewise, it has been used in the selection of dwarfing rootstocks to meet the needs of new production systems, where stomatal density has been proposed as a possible pre-selection index (Barrientos-Pérez & Sánchez-Colín, 1982), and it has been found that the higher the density of stomata in the leaves, the smaller the tree size (Barrientos-Priego & Sánchez-Colín, 1987).

The use of intergrafting can modify the stomatal density of 'Hass', 'Fuerte' and 'Duke 7' avocado leaves, and according to Ayala-Arreola et al. (2010), the intergrafting of 'Colín V-33' significantly increased the stomatal density of the final graft. Higher stomatal density has been related to smaller stomatal size, which can react quickly to unfavorable conditions (Drake, Froend, & Franks, 2013).

Because stomatal density is a characteristic that requires time to be defined, pre-selection of genotypes at early stages could be done by assessing porometer-measured stomatal conductance, as these characteristics are related (Taylor et al., 2012). Therefore, the aim of this research was to evaluate the relationships between stomatal and gas exchange characteristics of the leaf blade in avocado seedlings derived from 'Colín V-33' seed.

Materials and methods

Plant material

One hundred 'Colín V-33' avocado seeds from Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX S.C., located in Coatepec Harinas, State of Mexico, were used. The seeds were established in 600-gauge black bags (26 x 35 cm) with perforations in the first lower third. The substrate used was a mixture of soil, perlite and compost at a 3:1:1 ratio (v:v:v). Of the 100 seeds sown, 93 were used at six months of age and were

la frecuencia se ve afectados por una serie de factores. Algunos investigadores encontraron, en varias especies de cítricos y anona, que el número de estomas en la hoja varía con respecto al portainjerto utilizado (Schoch, Zinsou, & Sibi, 1980; Cañizares, Sanabria, Rodríguez, & Perozo, 2003; Parés-Martínez, Arizaleta, Sanabria, & Brito, 2004), y en aguacate se modifica por el interinjerto (Ayala-Arreola, Barrientos-Priego, Colinas-León, Sahagún-Castellanos, & Reyes-Alemán, 2010). Se ha reportado que el aguacate presenta de 100 a 610 estomas·mm⁻² en plantas provenientes de semilla (Kadman, 1965), y que puede variar con el perfil de la plántula, la raza de aguacate (Barrientos-Priego, Borys, Trejo, & López-López, 2003) y el genotipo (Barrientos-Priego & Sánchez-Colín, 1987).

En aguacate, 'Colín V-33', que tiene porte bajo y hábito de crecimiento expandido (Roe, Conradie, & Köhne, 1995), ha sido utilizado como injerto intermedio para reducir altura de árboles de la variedad Fuerte (Barrientos-Priego, López-Jiménez, & Sánchez-Colín, 1987) y 'Hass' (Barrientos-Villaseñor, Barrientos-Priego, Rodríguez-Pérez, Peña-Lomelí, & Muñoz-Pérez, 1999). Asimismo, se ha usado en la selección de portainjertos enanos que satisfagan las necesidades de los nuevos sistemas de producción, donde se ha propuesto como posible índice de preselección la densidad de estomas (Barrientos-Pérez & Sánchez-Colín, 1982), y se ha encontrado que a mayor densidad de estomas en las hojas menor porte del árbol (Barrientos-Priego & Sánchez-Colín, 1987).

El uso de interinjerto puede modificar la densidad estomática de la hoja de aguacate 'Hass', 'Fuerte' y 'Duke 7', y de acuerdo con Ayala-Arreola et al. (2010), el interinjerto de 'Colín V-33' aumentó significativamente la densidad estomática del injerto final. Una mayor densidad estomática se ha relacionado con menor tamaño de estomas, que pueden reaccionar rápidamente a condiciones desfavorables (Drake, Froend, & Franks, 2013).

Debido a que la densidad estomática es una característica que requiere tiempo para ser definida, la preselección de genotipos en etapas tempranas se podría realizar mediante la valoración de la conductancia estomática medida con porómetro, ya que estas características están relacionadas (Taylor et al., 2012). Por ello, el objetivo de la presente investigación fue evaluar las relaciones entre las características de los estomas y el intercambio de gases de la lámina foliar en plántulas de aguacate derivadas de semilla de 'Colín V-33'.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se utilizaron 100 semillas de aguacate 'Colín V-33' provenientes de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX S.C., localizada en Coatepec Harinas, Estado

watered twice a week to field capacity. Sowing was carried out in a glass greenhouse with temperatures ranging from 30 to 40 °C, relative humidity from 60 to 70 % and photosynthetically active radiation from 700 to 900 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, located at the Experimental Field of the Universidad Autónoma Chapingo (19° 29' 24.8" north latitude and 98° 52' 25.4" west longitude).

Gas exchange variables

In each plant, the eleventh leaf, counted from the base of the stem to the apex of the plant, and which was fully expanded, mature and healthy, was identified and marked as recommended by Barrientos-Priego et al. (2003), since greater stomatal density and stabilization of epidermal cell density have been observed in them. An infrared gas analyzer (CI-340, CID Bio-Science, USA) was used to estimate the CO_2 assimilation rate ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), transpiration rate ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), leaf temperature (°C), internal CO_2 concentration (ppm) and stomatal conductance ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Punctual measurements were made during three sunny days between 11:00 and 13:30 h; subsequently, the three values were averaged.

Leaf anatomical variables

On the same leaves, after taking the readings of the gas exchange variables, an impression of the underside of the middle part was obtained with fluid silicone for impressions (Exactoden), both on the right and left sides. For the positive impression of each side, clear nail polish was applied on the impression (negative) and placed on a slide.

For the positive impressions on each side, stomatal density (SD) per mm^2 , epidermal cell density (ECD) per mm^2 and stomatal index: $\text{SI} = [\text{SD}/(\text{SD}+\text{ECD})] \times 100$ (Fricker & Willmer, 2012) were calculated. These variables were evaluated in five fields (40x objective and 10x eyepiece; Ayala-Arreola et al., 2010) in a microscope (B3 Professional Series, Motic™, USA) coupled with a camera (Moticam 480) with a 16 mm adapter. Stomata counts, epidermal cell counts, and stomata length measurement were performed with the aid of an ImageJ 1.52a image analyzer (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012).

Statistical analysis

Basic statistics such as maximum, mean, minimum and coefficient of variation values were calculated, and a correlation analysis was performed between the data of the physiological and stomata variables of the leaves. In addition, *t*-tests were carried out to determine differences between the sampling of the two sides of the leaves and the stomata variables. Analyses were performed using SAS ver. 9.2 statistical software (SAS Institute, 2009).

de México. Las semillas se establecieron en bolsas negras de calibre 600 (26 x 35 cm) con perforaciones en el primer tercio inferior. El sustrato empleando fue una mezcla de suelo, perlita y composta en una relación 3:1:1 (v:v:v). De las 100 semillas sembradas, se utilizaron 93 con seis meses de edad y se regaron dos veces por semana a capacidad de campo. La siembra se realizó en un invernadero de cristal con temperaturas de 30 a 40 °C, humedad relativa de 60 a 70 % y radiación fotosintéticamente activa de 700 a 900 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, ubicado en el Campo Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo (19° 29' 24.8" latitud norte y 98° 52' 25.4" longitud oeste).

Variables de intercambio de gases

En cada planta se identificó y marcó la hoja número 11 contada desde la base del tallo hacia el ápice de la planta, y que estuviera completamente expandida, madura y sana, como lo recomendaron Barrientos-Priego et al. (2003), ya que se ha observado mayor densidad estomática y estabilización de la densidad de células epidérmicas. Se utilizó un analizador de gases infrarrojo (CI-340, CID Bio-Science, EUA) para estimar la tasa de asimilación de CO_2 ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), la tasa de transpiración ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), la temperatura de la hoja (°C), la concentración interna de CO_2 (ppm) y la conductancia estomática ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Se realizaron mediciones puntuales durante tres días soleados entre las 11:00 y las 13:30 h; posteriormente, se promediaron los tres valores.

Variables anatómicas en hoja

En las mismas hojas, después de realizar las lecturas de las variables de intercambio de gases, se obtuvo una impresión del envés de la parte media con silicón fluido para impresiones (Exactoden), tanto del lado derecho como del izquierdo. Para la impresión positiva de cada lado, se aplicó barniz transparente para uñas sobre la impresión (negativo) y se colocó sobre un portaobjeto.

En las impresiones positivas de cada lado, se calculó la densidad estomática (DE) por mm^2 , la densidad de células epidérmicas (DCE) por mm^2 y el índice estomático: $\text{IE} = [\text{DE}/(\text{DE}+\text{DCE})] \times 100$ (Fricker & Willmer, 2012). Dichas variables se evaluaron en cinco campos (40x de objetivo y 10x de ocular; Ayala-Arreola et al., 2010) en un microscopio (B3 Professional Series, Motic™, EUA) acoplado con una cámara (Moticam 480) con un adaptador de 16 mm. Los conteos de estomas, células epidérmicas y medición de longitud de estomas se realizaron con la ayuda del analizador de imágenes ImageJ 1.52a. (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012).

Análisis estadístico

Se calcularon los estadísticos básicos como valor máximo, medio, mínimo y coeficiente de variación, y se

Results and discussion

According to the observed stomata distribution, avocado leaves were classified as hypostomatic, which agrees with Kofidis et al. (2004). This characteristic is common in fruit and forest trees, as it is a protection mechanism for the plant's stomata to avoid excess transpiration. According to Camargo and Marenco (2011), the hypostomatic characteristic is considered a primitive trait in plants, while Rendón-Anaya et al. (2019) considered avocado a basal lineage species, close to the origin of flowering plants.

The distribution of stomata on the abaxial surface had no specific arrangement, as they were observed scattered throughout the underside of the leaf (Figure 1), a trait that is also considered primitive (Camargo & Marenco, 2011) and, in the case of avocado, they have been found distributed on the abaxial surface, with no differences between the apical, middle and basal part of the leaf (Morales-Escobar, Barrientos-Priego, Barrientos-Pérez, & Martínez-Damián, 1992). According to what was obtained in the *t*-test, there is no difference between the two sides of the leaf in the abaxial part ($P = 0.615$).

The arrangement of epidermal cells around the guard cells (Figure 1) allowed classifying the stomata as anomocytic, whose main characteristics are that they do not have adjoining or accompanying cells and that they have four or more subsidiary cells that vary in position, shape and size (Prabhakar, 2004). That is, the

realizó un análisis de correlación entre los datos de las variables fisiológicas y de estomas de las hojas. Además, se realizaron pruebas de *t* para determinar diferencias entre el muestreo de los dos lados de las hojas y las variables de estomas. Los análisis se realizaron con el programa estadístico SAS ver. 9.2 (SAS Institute, 2009).

Resultados y discusión

De acuerdo con la distribución de estomas observada, las hojas de aguacate se clasificaron como hipoestomáticas, lo cual concuerda con Kofidis et al. (2004). Esta característica es común en árboles frutales y forestales, ya que es un mecanismo de protección de estomas de la planta para evitar exceso de transpiración. Según Camargo y Marenco (2011), la característica hipoestomático es considerada como un rasgo primitivo en las plantas, mientras que Rendón-Anaya et al. (2019) consideraron al aguacate una especie de linaje basal, cerca del origen de plantas con flor.

La distribución de estomas en la superficie abaxial no tuvo arreglo específico, ya que se observaron esparcidos por todo el envés de la hoja (Figura 1), característica que también se considera como primitiva (Camargo & Marenco, 2011) y, en el caso del aguacate, se han encontrado distribuidos en la superficie abaxial, sin diferencias entre la parte apical, media y basal de la hoja (Morales-Escobar, Barrientos-Priego, Barrientos-Pérez, & Martínez-Damián, 1992). De acuerdo con lo obtenido en la prueba de *t*, no existe diferencia entre ambos lados de la hoja en su parte abaxial ($P = 0.615$).

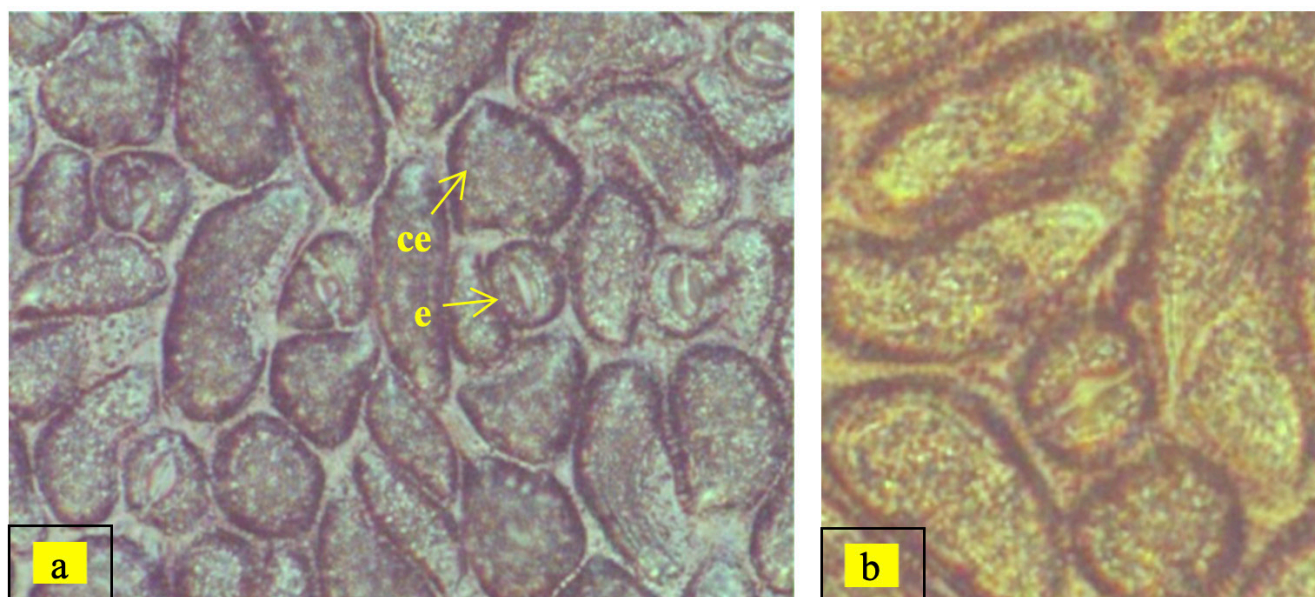


Figure 1. Frontal view of the abaxial surface of the leaf blade of a *Persea americana* Mill. 'Colón V-33' seedling: a) distribution of stomata (e) and typical epidermal cells (ce), and b) detail of an anomocytic stoma.

Figura 1. Vista frontal de la superficie abaxial de la lámina foliar de plántula de *Persea americana* Mill. 'Colón V-33': a) distribución de estomas (e) y células epidérmicas típicas (ce), y b) detalle de un estoma anomocítico.

cells surrounding the stoma do not differ from other epidermal cells.

On average, stomata length ranged from 13.11 to 19.64 μm , being 16.35 μm on the right side of the underside of the leaf blade and 16.06 μm on the left side (Table 1), with no statistical differences between the two sides of the leaf blade ($P = 0.757$). Drake et al. (2013) state that under unfavorable conditions small stomata have a faster response than large stomata, and combined with high stomatal density show high conductance. Thus, these characteristics can be considered in a comprehensive selection for high stomatal conductance, probably accompanied by a high photosynthetic capacity. These principles can be applied to plant selection in plant breeding.

The density of stomata in leaf number eleven of 'Colín V-33' plants varied between 105.88 and 317.65 stomata- mm^2 . This interval agrees with that reported by Barrientos-Priego et al. (2003), who stated that in leaf 11 a higher stomatal density is detected in three avocado races, ranging from 100 to 610 stomata- mm^2 in various races and cultivars. These values are within those established for the underside of leaves of C_3 plants (Leegood, 1993). The variation found gives the opportunity to select contrasting genotypes with respect to stomatal density, and may be useful for dwarfing, as proposed by Barrientos-Priego and

La disposición de las células epidérmicas alrededor de las células oclusivas (Figura 1) permitió clasificar a los estomas como anomocíticos, cuyas características principales son que no presentan células anexas o acompañantes y que tienen cuatro o más células subsidiarias que varían en posición, forma y tamaño (Prabhakar, 2004). Es decir, las células que rodean al estoma no presentan diferencias con las otras células epidérmicas.

En promedio, la longitud de los estomas varió de 13.11 a 19.64 μm , siendo de 16.35 μm en el lado derecho del envés de la lámina foliar y de 16.06 μm en el lado izquierdo (Cuadro 1), sin diferencias estadísticas entre ambos lados de la lámina ($P = 0.757$). Drake et al. (2013) afirman que en condiciones desfavorables los estomas pequeños tienen una respuesta más rápida que los estomas grandes, y combinados con la alta densidad estomática muestran alta conductancia. Así, estas características pueden ser consideradas en la selección integral para alta conductancia estomática acompañada, probablemente, de una alta capacidad fotosintética. Estos principios pueden ser aplicados a la selección de plantas en mejoramiento genético.

La densidad de estomas en la hoja número once de las plantas de 'Colín V-33' varió entre 105.88 y 317.65 estomas- mm^2 . Dicho intervalo coincide con lo reportado por Barrientos-Priego et al. (2003), quienes

Table 1. Statistics of anatomical and physiological characteristics of leaf 11 of 'Colín V-33' avocado seedlings.

Cuadro 1. Estadísticos de características anatómicas y fisiológicas de la hoja 11 de plántulas de aguacate 'Colín V-33'.

Variable	Maximum/ Máximo	Mean/ Medio	Minimum/ Mínimo	CV (%)
Stomatal density (stomata- mm^2)/ Densidad estomática (estomas- mm^2)	317.65	188.24	105.88	20.71
Epidermal cell density (stomata- mm^2)/ Densidad de células epidérmicas (estomas- mm^2)	1,267.65	808.82	582.35	17.5
Stomatal index (%)/ Índice estomático (%)	25.16	18.84	11.78	13.85
Stomata length (μm)/ Longitud de estoma (μm)	19.64	16.00	13.11	8.48
Leaf temperature ($^{\circ}\text{C}$)/ Temperatura de hoja ($^{\circ}\text{C}$)	28.53	26.7	23.23	4.45
CO_2 assimilation ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)/ Asimilación de CO_2 ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	3.97	1.15	-0.06	60.05
Transpiration ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)/ Transpiración ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	2	0.79	0.32	45.32
Stomatal conductance ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)/ Conductancia estomática ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	105.18	29.55	9.33	57.41
Internal CO_2 concentration (ppm)/ Concentración interna de CO_2 (ppm)	352.87	238.87	67.33	20.32

CV: coefficient of variation

CV: coeficiente de variación

Sánchez-Colín (1987), who observed that higher stomatal density is associated with smaller avocado tree size.

Stomatal size and density are the variables most sensitive to changes in environmental conditions (Hetherington & Woodward, 2003), although they also respond to other factors such as the type of intergraft (Ayala-Arreola et al., 2010). It has been proposed to pre-select avocado genotypes at the seedling stage based on stomatal density (Barrientos-Pérez & Sánchez-Colín, 1982); however, it is important to consider the position of the leaf in the seed-derived seedling, since stomatal density varies, although it has been indicated that it stabilizes in leaf 11 (Barrientos-Priego et al., 2003).

The average stomatal index (SI) on both sides of the leaf varied between 11.78 and 26.16 % (Table 1). The change in SI depends on the radiation received and the environmental conditions occurring during the days preceding the differentiation of the leaf stomata (Fricker & Willmer, 2012). The SI also changes due to the effect of the rootstock, as in 'Persian' lime grafted on 'Carrizo' citrange (Cañizares et al., 2003), in 'Valencia' orange grafted on rootstocks tolerant to the citrus tristeza virus (Arrieta-Ramos et al., 2010) and in avocado when having an intergraft (Ayala-Arreola et al., 2010). For this reason, there are modifications in the SI in the grafted variety due to the effect of the rootstock.

The SI is considered a diagnostic characteristic used in plant systematics, because it generally remains unaltered. Such is the case of seed-derived avocado seedlings according to their leaf position, despite the great differences in stomatal density (Barrientos-Priego et al., 2003), which constitutes an attribute for the identification of genotypes in early stages of development under optimal growing conditions. However, it should be considered that the SI is affected by stressful conditions, both environmental and nutritional (Salas, Sanabria, & Pire, 2001), so the possible effects caused by stress conditions should always be considered.

Taylor et al. (2012) concluded that the density and SI of a species are important, as it has been shown that maximum stomatal conductance is determined by stomatal size and density, being lower in C_4 grass species than in C_3 species. The stomatal system controls CO_2 assimilation completely, and high temperatures inhibit its functioning due to stomatal closure caused by increased internal CO_2 ; however, if closure is slow, transpiration can continue. In the case of avocado, the stomatal system is highly sensitive to plant water stress (Barrientos-Priego & Rodríguez-Ontiveros, 1994). Another factor that modifies this system in avocado is the position of the leaf within the plant canopy, since

afirmaron que en la hoja 11 se detecta mayor densidad estomática en tres razas de aguacate, la cual oscila entre 100 y 610 estomas- mm^{-2} en diversas razas y cultivares. Estos valores están dentro de los establecidos para el envés de las hojas de las plantas C_3 (Leegood, 1993). La variación encontrada da la oportunidad de seleccionar genotipos contrastantes respecto a la densidad estomática, y pueden ser útiles para enanismo, como lo propusieron Barrientos-Priego y Sánchez-Colín (1987), quienes observaron que la mayor densidad estomática se asocia con un menor tamaño del árbol de aguacate.

El tamaño de los estomas y la densidad estomática son las variables más sensibles a cambios en las condiciones ambientales (Hetherington & Woodward, 2003), aunque también responden a otros factores como el tipo de interinjerto (Ayala-Arreola et al., 2010). Se ha propuesto hacer preselección de genotipos de aguacate en estado de plántula con base en la densidad estomática (Barrientos-Pérez & Sánchez-Colín, 1982); sin embargo, es importante considerar la posición de la hoja en la plántula derivada de semilla, ya que varía la densidad estomática, aunque se ha indicado que en la hoja 11 se estabiliza (Barrientos-Priego et al., 2003).

El IE promedio en ambos lados de la hoja varió entre 11.78 y 26.16 % (Cuadro 1). El cambio del IE depende de la radiación recibida y de las condiciones ambientales ocurridas durante los días precedentes a la diferenciación de los estomas de la hoja (Fricker & Willmer, 2012). El IE también cambia por efecto del portainjerto, como en lima 'Persa' injertada en citrange 'Carrizo' (Cañizares et al., 2003), en naranjo 'Valencia' injertado en portainjertos tolerantes al virus de la tristeza (Arrieta-Ramos et al., 2010) y en aguacate al tener un interinjerto (Ayala-Arreola et al., 2010). Por ello, existen modificaciones en el IE en la variedad injertada por efecto del portainjerto.

El IE es considerado una característica de diagnóstico utilizada en sistemática de plantas, porque generalmente se mantiene sin alteraciones. Tal es el caso de las plántulas de aguacate derivadas de semilla de acuerdo con su posición foliar, a pesar de las grandes diferencias en densidad de estomas (Barrientos-Priego et al., 2003), lo cual constituye un atributo para la identificación de genotipos en etapas tempranas de desarrollo bajo condiciones óptimas del cultivo. No obstante, se debe considerar que el IE es afectado por condiciones estresantes, tanto ambientales como nutrimentales (Salas, Sanabria, & Pire, 2001), por lo que siempre se deben considerar los posibles efectos causados por condiciones de estrés.

Taylor et al. (2012) concluyeron que la densidad y el IE de una especie son importantes, ya que se ha demostrado que la máxima conductancia estomática

the opening of the stomata is affected by light; that is, it is slower if the leaf has developed under shade (Heath & Arpaia, 2004).

In this study, the transpiration rate ranged from 0.32 to 2 mmol·m⁻²·s⁻¹ of H₂O (Cuadro 1), with a coefficient of variation of 45.32 %, denoting moderate variation. In addition, a positive and significant correlation was found between the variables stomatal conductance and transpiration rate ($r = 0.96^{**}$; $P \leq 0.01$; Table 2). Conductance refers to the control exerted by the stomata on the transpiration rate, which represents the ability of a water molecule to diffuse through the leaf per unit of time. A low stomatal conductance indicates lower CO₂ assimilation, and in turn a lower transpiration rate (Fricker & Willmer, 2012). The most important environmental factors affecting transpiration are solar radiation, air vapor pressure deficit, temperature, wind speed, CO₂ concentration, and soil moisture and nutrient availability (Sánchez-Díaz & Aguirreolea, 2008; Pritchard & Amthor, 2005).

There is a moderate negative correlation between the variables CO₂ assimilation rate and internal CO₂ concentration ($r = -0.64^{**}$), because the cells have a certain metabolic capacity to process the CO₂ that the plant can capture. When the CO₂ concentration is very high, the stomata close, stopping photosynthesis in the plant and saturating its metabolic machinery, which prevents the processing of more molecules and is known as the saturation point (Azcón-Bieto, Fleck, Aranda, & Gómez-Casanovas, 2008). Thus, as the CO₂ concentration increases, the net assimilation rate

está determinada por el tamaño y la densidad de estomas, siendo más bajo en especies de pastos C₄ que en especies C₃. El sistema estomático controla la asimilación de CO₂ completamente, y las temperaturas altas inhiben su funcionamiento debido al cierre estomático causado por aumento del CO₂ interno; sin embargo, si el cierre es lento, la transpiración puede continuar. En el caso del aguacate, el sistema estomático es altamente sensible al estrés hídrico de la planta (Barrientos-Priego & Rodríguez-Ontiveros, 1994). Otro factor que modifica este sistema en aguacate es la posición de la hoja dentro del dosel de la planta, ya que la apertura de los estomas se ve afectada por la luz; es decir, es más lenta si la hoja se desarrolló bajo sombra (Heath & Arpaia, 2004).

En este estudio, la tasa de transpiración varió de 0.32 a 2 mmol·m⁻²·s⁻¹ de H₂O (Cuadro 1), con coeficiente de variación de 45.32 %, lo cual denota una variación moderada. Además, se encontró una correlación positiva y significativa entre las variables conductancia estomática y tasa de transpiración ($r = 0.96^{**}$; $P \leq 0.01$; Cuadro 2). La conductancia se refiere al control ejercido por los estomas sobre la tasa de transpiración, lo cual representa la capacidad que tiene una molécula de agua de difundirse a través de la hoja por unidad de tiempo. Una conductancia estomática baja indica una menor asimilación de CO₂, y a su vez una menor tasa de transpiración (Fricker & Willmer, 2012). Los factores ambientales más importantes que afectan la transpiración son la radiación solar, el déficit de presión de vapor del aire, la temperatura, la velocidad del viento, la concentración de CO₂, y la disponibilidad

Table 2. Correlation coefficients between anatomical and physiological variables of leaf 11 of 'Colón V-33' avocado seedlings.

Cuadro 2. Coeficientes de correlación entre variables anatómicas y fisiológicas de la hoja 11 de plántulas de aguacate de 'Colón V-33'.

Variable	SD/DE	ECD/DCE	SI/IE	SL/LE	TEMP	A	E	Gs	Ci
SD/DE	1								
ECD/DCE	0.59**	1							
SI/IE	0.61**	-0.25*	1						
SL/LE	-0.11	-0.11	-0.01	1					
TEMP	0.14	0.27**	-0.07	0.43**	1				
A	0.09	-0.06	0.17	0.12	0.07	1			
E	0.03	0.05	-0.01	0.06	0.15	0.41**	1		
Gs	-0.02	-0.02	-0.02	-0.03	-0.06	0.35*	0.96**	1	
Ci	-0.04	0.11	-0.16	-0.10	-0.07	-0.64**	0.27	0.30**	1

SD: stomatal density; ECD: epidermal cell density; SI: stomatal index; SL: stomata length; TEMP: leaf temperature; A: CO₂ assimilation; E: transpiration; Gs: stomatal conductance; Ci: internal CO₂ concentration. * and ** significant at $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$, respectively.

DE: densidad estomática; DCE: densidad de células epidérmicas; IE: índice estomático; LE: longitud de estoma; TEMP: temperatura de la hoja; A: asimilación de CO₂; E: transpiración; Gs: conductancia estomática; Ci: concentración interna de CO₂. * y ** significativo a una $P \leq 0.05$ y $P \leq 0.01$, respectivamente.

also increases until the saturation level is reached, with kinetics specific to each species according to its photosynthetic mechanism (C_3 or C_4) (Azcón-Bieto et al., 2008). Considering that avocado is a species with C_3 photosynthetic behavior, this explains its better adaptation to cool and humid environments.

The increase in the internal CO_2 concentration indicated no stomata opening, which makes CO_2 assimilation impossible due to low gas exchange, and may generate a decrease in plant growth and development (Giuliani et al., 2016). Avocado leaf CO_2 assimilation is closely correlated with stomatal conductance under most conditions (Liu, Mickelbart, Robinson, Hofshi, & Arpaia, 2002), possibly because CO_2 assimilation is mainly determined by stomatal conductance (Scholefield, Walcott, Kriedemann, & Ramadasan, 1980). Nevertheless, according to what was found, there is a correlation between these variables ($r = 0.35^*$, $P \leq 0.05$) (Table 2), although it is considered a very weak relationship despite its significance (Schober, Boer, & Schwarte, 2018) and caution should be exercised in considering it as a true existing relationship (Taylor, 1990).

In the anatomical variables, a moderate positive correlation was observed between stomatal density and epidermal cell density ($r = 0.59^{**}$, $P \leq 0.01$), similar to the correlation coefficients found by Barrientos-Priego et al. (2003), which showed a positive and significant association between them. These authors also found a negative correlation between epidermal cell density and stomatal index, which was not corroborated in this study, as the coefficient was very low ($r = -0.25^*$, $P \leq 0.05$).

Stomatal density and stomatal size are considered key ecophysiological parameters in influencing stomatal conductance (Holland & Richardson, 2009). Based on the above, it is possible to consider the use of stomatal conductance as a quick test in the selection of genotypes, as an indirect measure of stomatal density, since this can be a way of separating short-sized genotypes as proposed by Barrientos-Priego and Sánchez-Colín (1987). However, no association was found between conductance and stomatal density ($r = -0.02$).

Conclusions

The leaves of 'Colín V-33' avocado seedlings have hypostomatic stomata and are classified as anomocytic.

The lack of association between stomatal characteristics (stomatal index and density) and gas exchange in leaf 11 of 'Colín V-33' avocado seedlings prevents recommending these variables as early selection criteria for breeding.

de humedad y nutrientes del suelo (Sánchez-Díaz & Aguirreolea, 2008; Pritchard & Amthor, 2005).

Entre las variables tasa de asimilación de CO_2 y concentración interna de CO_2 existe una correlación negativa moderada ($r = -0.64^{**}$), esto debido a que las células tienen cierta capacidad metabólica para procesar el CO_2 que puede captar la planta. Cuando la concentración de CO_2 es muy alta, los estomas se cierran cesando la fotosíntesis en la planta y saturando su maquinaria metabólica, lo cual impide el procesamiento de más moléculas y se conoce como punto de saturación (Azcón-Bieto, Fleck, Aranda, & Gómez-Casanovas, 2008). Así, al aumentar la concentración de CO_2 también aumenta la tasa de asimilación neta hasta alcanzar el nivel de saturación, con una cinética propia para cada especie según el mecanismo fotosintético que tenga (C_3 o C_4) (Azcón-Bieto et al., 2008). Al considerar que el aguacate es una especie de comportamiento fotosintético C_3 , se explica su mejor adaptación en ambientes frescos y húmedos.

El aumento en la concentración interna de CO_2 indicó que no hay apertura de estomas, lo que imposibilita la asimilación de CO_2 debido al bajo intercambio gaseoso, y puede generar una disminución del crecimiento y el desarrollo de la planta (Giuliani et al., 2016). La asimilación de CO_2 de la hoja de aguacate está estrechamente correlacionada con la conductancia estomática en la mayoría de las condiciones (Liu, Mickelbart, Robinson, Hofshi, & Arpaia, 2002), lo cual se debe, posiblemente, a que la asimilación de CO_2 está determinada principalmente por la conductancia estomática (Scholefield, Walcott, Kriedemann, & Ramadasan, 1980). No obstante, de acuerdo con lo encontrado, existe correlación entre estas variables ($r = 0.35^*$, $P \leq 0.05$) (Cuadro 2), aunque se considera una relación muy débil a pesar de su significancia (Schober, Boer, & Schwarte, 2018) y se debe tener precaución en su consideración como una verdadera relación existente (Taylor, 1990).

En las variables anatómicas se observó una correlación positiva moderada entre la densidad de estomas y la densidad de células epidérmicas ($r = 0.59^{**}$, $P \leq 0.01$), similar a los coeficientes de correlación encontrados por Barrientos-Priego et al. (2003), los cuales mostraron una asociación positiva y significativa entre ellas. Estos autores también encontraron correlación negativa entre la densidad de células epidérmicas y el índice estomático, lo que no se corroboró en este estudio, ya que el coeficiente fue muy bajo ($r = -0.25^*$, $P \leq 0.05$).

La densidad estomática y el tamaño de estomas son considerados como parámetros ecofisiológicos clave en la influencia sobre la conductancia estomática (Holland

Due to the variation found in stomatal density and stomatal index, it is possible to select contrasting genotypes that could have an impact on grafting when used as rootstocks, given the evidence from other studies where there are modifications in these variables.

Acknowledgments

We acknowledge the support of Dr. María de la Cruz Espíndola Barquera of the Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX S.C. and the scholarship granted by CONACYT for the graduate studies of the first author.

End of English version

References / Referencias

- Acosta-Rangel, A., Ávila-Lovera, E., de Guzman, M. E., Torres, L., Haro, R., Arpaia, M. L., Focht, E., & Santiago, L. S. (2018). Evaluation of leaf carbon isotopes and functional traits in avocado reveals water-use efficient cultivars. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 263, 60-66. doi: 10.1016/j.agee.2018.04.021
- Acosta-Rangel, A. M., Li, R., Celis, N., Suarez, D. L., Santiago, L. S., Arpaia, M. L., & Mauk, P. A. (2019). The physiological response of 'Hass' avocado to salinity as influenced by rootstock. *Scientia Horticulturae*, 256, 108629. doi: 10.1016/j.scientia.2019.108629
- Arrieta-Ramos, B., Villegas-Monter, A., Hernández-Bautista, A., Rodríguez-Mendoza, M. N. Ruiz-Posadas, L. M., & García-Villanueva, E. (2010). Estomas y vigor de naranjo 'Valencia' injertado en portainjertos tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33(3), 257-263. doi: 10.35196/rfm.2010.3.257
- Assmann, S. M., & Gershenson, A. (1991). The kinetics of stomatal responses to VPD in *Vicia faba*: electrophysiological and water relations models. *Plant Cell*, 14(5), 455-465. doi: 10.1111/j.1365-3040.1991.tb01515.x
- Ayala-Arreola, J., Barrientos-Priego, A. F., Colinas-León, M. T., Sahagún-Castellanos, J., & Reyes-Alemán, J. C. (2010). Relaciones injerto-interinjerto y características anatómicas y fisiológicas de la hoja de cuatro genotipos de aguacate. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 16(2), 147-154. doi: 10.5154/r.rchsh.2010.16.018
- Azcón-Bieto, J., Fleck, I., Aranda, X., & Gómez-Casanovas, N. (2008). Transpiración y control estomático. In: Azcón-Bieto, J. & Talón, M. (Eds.), *Fundamentos de fisiología vegetal* (pp. 247-263). España: McGraw-Hill Interamericana.
- Barrientos-Pérez, F., & Sánchez-Colín, S. (1982). Height variability obtained from a new dwarf avocado tree population. *Acta Horticulturae*, 140, 163-168. doi: 10.17660/ActaHortic.1983.140.21
- Barrientos-Priego, A. F., & Sánchez-Colín, S. (1987). Stomatal density and its relationship with growth habit in avocado. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, 10, 66-67. Retrieved from http://avocadosource.com/WAC1/WAC1_p066.pdf
- Barrientos-Priego, A., López-Jiménez, A., & Sánchez-Colín, S. (1987). Effect of Colín V-33 as interstock on avocado (*Persea americana* Mill.) growth, cv. Fuerte. *South African Avocado Growers Association Yearbook*, 10, 62-63. Retrieved from http://avocadosource.com/WAC1/WAC1_p062.pdf
- Barrientos-Priego, A. F., & Rodríguez-Ontiveros, J. L. (1994). Respuesta de plantas de aguacate cv. Hass bajo condiciones de sequía. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 1(2), 191-198. doi: 10.5154/r.rchsh.1994.02.016
- Barrientos-Priego, A. F., Borys, M. W., Trejo, C., & López-López, L. (2003). Índice y densidad estomática foliar en plántulas de tres razas de aguacatero. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 26(4), 285-290. Retrieved from <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/26-4/10a.pdf>
- & Richardson, 2009). Con base en lo anterior, es posible considerar el uso de la conductancia estomática como una prueba rápida en la selección de genotipos, como una medida indirecta de la densidad estomática, ya que ésta puede ser una forma de separar genotipos de porte bajo como lo proponen Barrientos-Priego y Sánchez-Colín (1987). Sin embargo, no se encontró ninguna asociación entre la conductancia y la densidad estomática ($r = -0.02$).

Conclusiones

Las hojas de plántulas de semilla de aguacate 'Colín V-33' tienen estomas tipo hipoestomáticos y se clasifican como anomocíticos.

La falta de asociación entre las características de los estomas (índice y densidad estomática) y el intercambio de gases en la hoja 11 de plántulas de semilla de aguacate 'Colín V-33' evita recomendar estas variables como criterios de selección temprana para el mejoramiento genético.

Debido a la variación encontrada en densidad e índice estomático es posible seleccionar genotipos contrastantes que podrían tener impacto en el injerto cuando sean utilizados como portainjertos, dada la evidencia de otros estudios donde hay modificaciones en dichas variables.

Agradecimientos

Se reconoce el apoyo de la Dra. María de la Cruz Espíndola Barquera de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX S.C. y de la beca otorgada por el CONACYT para estudios de posgrado de la primera autora.

Fin de la versión en español

- Barrientos-Villaseñor, A., Barrientos-Priego, A. F., Rodríguez-Pérez, J. E., Peña-Lomelí, A., & Muñoz-Pérez, R. (1999). Influencia del interinjerto 'Colin V33' sobre algunos aspectos fisiológicos en aguacatero (*Persea americana* Mill.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5, 103-116. doi: 10.5154/r.rchsh.1999.07.051
- Camargo, M. A., & Marenco, R. A. (2011). Density, size and distribution of stomata in 35 rainforest tree species in Central Amazonia. *Acta Amazonica*, 41(2), 205-212. doi: 10.1590/s0044-59672011000200004
- Cañizares, A., Sanabria, M. E., Rodríguez, D. A., & Perozo, Y. (2003). Características de los estomas, índice y densidad estomática de las hojas de lima Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka) injertada sobre ocho patrones cítricos. *Revista UDO Agrícola*, 3(1), 59-64. Retrieved from <http://udoagricola.orgfree.com/V3UDOAg/V3Canizares59.pdf>
- Drake, P. L., Froend, R. H., & Franks, P. J. (2013). Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. *Journal of Experimental Botany*, 64(2), 495-505. doi: 10.1093/jxb/ers347
- Fricker, M., & Willmer, C. (2012). *Stomata*. Netherlands: Springer Science & Business Media.
- Gil, P. M., Gurovich, L., Schaffer, B., García, N., & Iturriaga, R. (2009). Electrical signaling, stomatal conductance, ABA and ethylene content in avocado trees in response to root hypoxia. *Plant Signaling & Behavior*, 4(2), 100-108. doi: 10.4161/psb.4.2.7872
- Giuliani, R., Magnanini, E., Muzzi, E., Nerozzi F., Tombesi, S., Palliotti A., Gatti, M., & Poni, S. (2016). An enhanced method to infer gas exchange function in 48 peach trees having different canopy shapes based on canopy quantum flux absorption assessment. *Agricultural and Forest Meteorology*, 221, 1-12. doi: 10.1016/j.agrformet.2016.01.141
- Heath, R., & Arpaia, M. (2004). Avocado tree physiology - understanding the basis of productivity. *Proceedings of the California Avocado Research Symposium*, 65-88. Retrieved from http://www.avocadosource.com/arac/symposium_2004/arac2004_pg_65.pdf
- Hetherington, A. M., & Woodward, F. I. (2003). The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, 424, 901-908. doi: 10.1038/nature01843
- Holland, N., & Richardson, A. D. (2009). Stomatal length correlates with elevation of growth in four temperate species. *Journal of Sustainable Forestry*, 28(2), 63-73. doi: 10.1080/10549810802626142
- Kadman, A. (1965). Influence of transpiration and some other factors on the uptake, transport and accumulation of chlorine and sodium in avocado seedlings. *Use of Isotopes and Radiation in Soil Plant Nutrition Studies*, 539-562.
- Kofidis, G., Bosabalidis, A. M., & Chartzoulakis, K. (2004). Leaf anatomical alterations induced by drought stress in two avocado cultivars. *Journal of Biological Research*, 1, 115-120. Retrieved from <http://www.jbr.gr/papers2004/13-2004.pdf>
- Leegood, R. C. (1993). Carbon dioxide concentrating mechanisms. In: Lea, P. J., & Leegood, R. C. (Eds.), *Plant biochemistry and molecular biology*. USA: John Wiley and Sons, Ltd.
- Liu, X., Mickelbart, M. V., Robinson, P. W., Hofshi, R., & Arpaia, M. L. (2002). Photosynthetic characteristics of avocado leaves. *Acta Horticulturae*, 575, 865-874. doi: 10.17660/ActaHortic.2002.575.103
- Morales-Escobar, L., Barrientos-Priego, A. F., Barrientos-Pérez, F., & Martínez-Damián, M. T. (1992). *Obtención de poliploides en aguacate (Persea americana Mill.) mediante el uso de colchicina*. México: Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX S.C.
- Parés-Martínez, J., Arizaleta, M., Sanabria, M. E., & Brito, L. (2004). Características de los estomas, densidad e índice estomático y su variación en función a la injertación en *Annona muricata* y *A. montana* (Annonaceae). *Bioagro*, 16(3), 213-218. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/857/85716309.pdf>
- Prabhakar, M. (2004). Structure, delimitation, nomenclature and classification of stomata. *Acta Botanica Sinica*, 46(2), 246-252. Retrieved from <https://www.jipb.net/EN/Y2004/V46/I2/242#1>
- Pritchard, S. G., & Amthor, J. S. (2005). *Crops and environmental change: an introduction to effects of global warming, increasing atmospheric CO₂ and O₃ concentrations, and soil salinization on crop physiology and yield*. USA: Food Products Press.
- Rendón-Anaya, M., Ibarra-Laclette, E., Méndez-Bravo, A., Lan, T., Zheng, C., Carretero-Paulet, L., ... Herrera Estrella, L. (2019). The avocado genome informs deep angiosperm phylogeny, highlights introgressive hybridization, and reveals pathogen-influenced gene space adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(34), 17081-17089. doi: 10.1073/pnas.1822129116
- Roe, D. J., Conradie, W., & Köhne, J. S. (1995). Progress with rootstock research at Merensky Technological Services. *South African Growers' Association Yearbook*, 18, 10-11. Retrieved from http://avocadosource.com/Journals/SAAGA/SAAGA_1995/SAAGA_1995_PG_010-011.pdf
- Salas, J., Sanabria, M., & Pire, R. (2001). Variación en el índice y densidad estomática en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sometidas a tratamientos salinos. *Bioagro*, 13(3), 99-104. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/857/85713302.pdf>
- Sánchez-Colín, S., Rubí-Arriaga, M., & de la Cruz-Torres, E. (1992). Selection of dwarf avocado trees within a population of seedlings of cv. Colin V-33. *Proceedings of World Avocado Congress*, 2, 527-530. Retrieved from http://avocadosource.com/WAC2/WAC2_p527.pdf
- Sánchez-Díaz, M., & Aguirreolea, J. (2008). Transpiración y control estomático. In: Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (Eds.), *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (pp. 41-56). España: McGraw-Hill Interamericana.
- SAS Institute Inc. (2009). *Statistical Analysis System: User's guide*, ver. 9.2. USA: Author.
- Schneider, C. A., Rasband, S. W., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675. doi: 10.1038/nmeth.2089
- Schober, P., Boer, C., & Schwarte, L. A. (2018). Correlation coefficients: appropriate use and interpretation.

- Anesthesia & Analgesia*, 126, 1763-1768. doi: 10.1213/ANE.0000000000002864
- Schoch, P. G., Zinsou, C., & Sibi, M. (1980). Dependence of the stomatal index on environmental factors during stomatal differentiation in leaves of *Vigna sinensis* L.: 1. Effect of light intensity. *Journal of Experimental Botany*, 31(5), 1211-1216. doi: 10.1093/jxb/31.5.1211
- Scholefield, P. B., Walcott, J. J., Kriedemann, P. E., & Ramadasan, A. (1980). Some environmental effects on photosynthesis and water relations of avocado leaves. *California Avocado Society Yearbook*, 64, 93-105. Retrieved from http://avocadosource.com/CAS_Yearbooks/CAS_64_1980/CAS_1980_PG_93-106.pdf
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Plant physiology*. USA: Sinauer Associates Inc. Publishers.
- Taylor, R. (1990). Interpretation of the correlation coefficient: a basic review. *Journal of Diagnostic Medical Sonography*, 6, 35-39. doi: 10.1177/875647939000600106
- Taylor, S. H., Franks, P. J., Hulme, S. P., Spriggs, E., Christin, P. A., Edwards, E. J., Woodward, F. I., & Osborne, C. P. (2012). Photosynthetic pathway and ecological adaptation explain stomatal trait diversity among grasses. *New Phytologist*, 193(2), 387-396. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03935.x