

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO DE LA BIOLOGÍA
REPRODUCTIVA DE LA MANDARINA 'AFOURER'
[*Citrus reticulata* Blanco]

por

Andrea Carolina FASIOLO FERREIRO
Floencia Amelia REY ROBAINA

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO
URUGUAY
2013

Tesis aprobada por:

Director:

Ing. Agr. M Sc Alfredo Gravina

Ing. Agr. Dra. Giuliana Gambetta

Ing. Agr. Beatriz Vignale

Fecha:

29 de noviembre de 2013

Autor:

Andrea Carolina Fasiolo Ferreiro

Florencia Amelia Rey Robaina

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar queremos agradecer a nuestros padres y familias, por el apoyo a lo largo de la carrera.

También a nuestros amigos, por estar siempre presentes.

Al grupo de ecofisiología de frutales: Xime, Santi, Seba, Marcelo, Cecilia, Cristian, Viro, por ayudarnos en el trabajo y su amistad.

Al departamento de Biología Vegetal, por prestarnos el microscopio de fluorescencia. A Paola Gaiero y Cristina Mazella por enseñarnos a utilizarlo. A Pedro Díaz del laboratorio de Bioquímica por el apoyo en tareas de laboratorio.

A nuestros tutores, Alfredo y Giuliana, por los aportes y correcciones a lo largo de este trabajo y a Beatriz Vignale por ser parte del tribunal.

A compañeros, docentes y funcionarios de la Facultad de Agronomía, especialmente Sully Toledo por las correcciones.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1. ASPECTOS GENERALES.....	3
2.1.1. <u>Origen de los cítricos</u>	3
2.1.2. <u>Taxonomía</u>	3
2.1.3. <u>Citricultura en el mundo</u>	3
2.1.4. <u>Citricultura en el Uruguay</u>	4
2.1.4.1. Variedad 'Afourer'.....	4
2.2. REPRODUCCIÓN EN LOS CÍTRICOS.....	5
2.2.1. <u>Tipos de reproducción</u>	5
2.2.2. <u>Floración</u>	6
2.2.2.1. Morfología y anatomía de la flor.....	7
2.2.2.2. Desarrollo de gametos femeninos.....	9
2.2.2.3. Desarrollo de gametos masculinos.....	10
2.2.3. <u>Polinización</u>	11
2.2.3.1. Período de polinización efectiva.....	11
2.2.3.2. Factores que afectan la polinización.....	12
2.2.4. <u>Fecundación</u>	14
2.2.4.1. Formación de semillas.....	14
2.2.5. <u>Cuajado y fructificación</u>	14
2.3. PARTENOCARPIA.....	17
2.4. ESTERILIDAD Y COMPATIBILIDAD.....	18
2.5. CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE FRUTOS.....	20

2.5.1. <u>Factores que afectan el crecimiento de frutos</u>	21
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	23
3.1. MATERIAL VEGETAL	23
3.2. EXPERIMENTO 1.....	23
3.3. EXPERIMENTO 2.....	25
3.4. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE FLORES.....	26
3.5. GERMINACIÓN DE POLEN <i>in vitro</i>	27
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	29
4.1. GERMINACIÓN DE POLEN Y ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE FLORES.....	29
4.1.1. <u>Germinación de polen <i>in vitro</i></u>	29
4.1.2. <u>Germinación de granos de polen en el estigma</u>	30
4.1.3. <u>Crecimiento del tubo polínico en el estilo</u>	32
4.1.4. <u>Viabilidad de óvulos</u>	35
4.2. POLINIZACIÓN CRUZADA Y PRESENCIA DE SEMILLAS.....	39
4.2.1. <u>Evolución de la abscisión y porcentaje de cuajado final</u>	39
4.2.2. <u>Presencia y número de semillas</u>	42
4.2.3. <u>Tamaño de frutos</u>	44
5. <u>CONCLUSIONES</u>	47
6. <u>RESUMEN</u>	48
7. <u>SUMMARY</u>	49
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	50

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Porcentaje de germinación <i>in vitro</i> de polen de limón tipo 'Lisbon', tangor 'Ortanique' y mandarino 'Afourer', en los dos experimentos.	29
2. Porcentaje de germinación de granos de polen de mandarino 'Afourer' y tangor 'Ortanique' en el estigma de flores de 'Afourer'.....	30
3. Porcentaje de estilo recorrido por tubos polínicos de 'Afourer' y 'Ortanique' en las fechas de muestreo.	33
4. Porcentaje de viabilidad de óvulos de mandarina 'Afourer' en los experimentos 1 y 2 por fecha de muestreo.	36
5. Humedad relativa y precipitaciones: previo a la antesis, antesis, y post-antesis, en los años 2010 y 2011.	38
6. Porcentaje de cuajado final y porcentaje de frutos con semillas, por tipo de polinización.....	40
7. Número promedio de semillas por fruto provenientes de flores de 'Afourer' polinizadas con 'Ortanique' y limón tipo 'Lisbon'.	42
8. Diámetro ecuatorial de frutos al momento de la cosecha en los diferentes tratamientos.	45
Figura No.	
1. Esquema de la morfología de la flor de cítricos, microesporangio y megásporangio, adaptado de UdelaR (URUGUAY). FA (2010).	9
2. Foto aérea del cuadro de mandarina 'Afourer' utilizado (A) y variedades cercanas.	23
3. Estado botón alargado (A), Flor emasculada (B) Polinización manual de la flor (C), Flor embolsada (D).	24

4. Fotografía de germinación <i>in vitro</i> de granos de polen de ‘Afourer’ (A), ‘Ortanique’ (B) y limón tipo ‘Lisbon’ (C).	30
5. Estigma de flores de ‘Afourer’ con: granos de polen de ‘Afourer’ sin germinar en el día 0 (A), germinados y con crecimiento de tubo polínico en el día 4 (B y C) y tubos polínicos en el día 6 (D); granos de polen de ‘Ortanique’ en el día 0 (E) y tubos polínicos en el día 6 (F).	31
6. Óvulos de ‘Afourer’ en el día 13 polinizados con limón tipo ‘Lisbon’ (A), ‘Ortanique’ (B) y en libre polinización (C).	35
7. Óvulos en el día 0, día 8 y día 14 de: ‘Afourer’ (A, B y C, respectivamente) y ‘Ortanique’ (D, E y F, respectivamente).	37
8. Evolución del cuajado de frutos provenientes de flores en condiciones de libre polinización, polinizadas con limón tipo ‘Lisbon’ y ‘Ortanique’.	40
9. Cortes transversales de frutos cosechados por tratamiento: frutos polinizados con limón tipo ‘Lisbon’ (A), frutos polinizados con polen de ‘Ortanique’ (B) y frutos en libre polinización (C).	43
10. Evolución del diámetro ecuatorial de frutos de mandarina ‘Afourer’, por tratamiento de polinización.	44
11. Correlación entre No. de semillas por fruto y diámetro de fruto, en mandarina ‘Afourer’.	45

1. INTRODUCCIÓN

La citricultura uruguaya ocupa una superficie efectiva de 16.250 hectáreas, siendo las naranjas, mandarinas, limones y pomelos las especies de cítricos más plantadas. Las naranjas son las que ocupan mayor superficie, 50 % del total, seguidas por las mandarinas, 38 %, y limones y pomelos que ocupan un 11 % y 1 % respectivamente (MGAP. DIEA, 2012).

El objetivo principal de nuestra citricultura es la exportación de fruta para su consumo en fresco, exportándose entre el 45 y 48 % de la producción, en los últimos años (MGAP. DIEA, 2012).

La calidad de fruta para exportación es un factor muy importante ya que establece el acceso a los mercados y su valor comercial. El concepto de calidad, abarca características externas e internas, y varía según la especie y variedad que se trate. Para el caso de las mandarinas, la tendencia de los mercados es demandar frutos sin semillas, de fácil pelado, sanos y de buen sabor. La definición de fruto sin semillas ha ido cambiando con el tiempo. Mientras que en los años 80 se definía comercialmente como aquellos frutos que presentaban menos de cinco semillas, actualmente esa exigencia es en general mayor y para cultivares de fuerte demanda por su calidad organoléptica se acepta una semilla por fruto (Barry, 2004).

La mandarina 'Afourer' es un cultivar de reciente introducción en el país, cuya superficie ha pasado de representar 0,8 % en 2006 a 4,9 % en 2012 (MGAP. DIEA, 2012). Se caracteriza por su rápida entrada en producción, muy buena productividad, y su capacidad de producir frutos de alta calidad organoléptica (Saunt 2000, Agustí et al. 2005). Es un cultivar patentado, registrado como autoincompatible, que en ausencia de polinización cruzada, produce frutos sin semillas (Saunt 2000, Chao 2005a, Gravina et al. 2011).

En nuestras condiciones, se ha registrado una productividad de 42 kg por planta (MGAP. DIEA, 2012). Sin embargo la calidad, caracterizada en este cultivar por la ausencia de semillas, se ve disminuida por una constante presencia de las mismas en los frutos. El valor comercial de los frutos sin semillas alcanza el doble del precio en el mercado en comparación con los que las presentan.

Existe poco conocimiento sobre la biología reproductiva de 'Afourer', y los parámetros que determinan su período de polinización efectiva. Resultados nacionales sobre la capacidad polinizadora de otras variedades sobre flores de 'Afourer' reportan que, el polen de naranjo 'Valencia' es un buen polinizador, resultando en un alto porcentaje de frutos con semillas y alto número de semillas por fruto. Por el contrario 'Clementina de Nules', no generó polen viable y por lo tanto semillas, mientras que el limón tipo 'Lisbon' y tangor 'Ortanique', presentaron una baja capacidad de producción de semillas en 'Afourer' (Gravina et al., 2011). En España el polen de Clementinas, 'Fortune', 'Ortanique' y 'Nova' han demostrado una alta capacidad polinizadora en 'Afourer' (Bono et al., 2000).

Debido a esta problemática en nuestras condiciones, se plantean los siguientes objetivos:

- Determinar el período de viabilidad de los óvulos y el crecimiento del tubo polínico, en condiciones de autopolinización y polinización cruzada en mandarina 'Afourer'.
- Determinar la presencia de semillas, el cuajado y tamaño de frutos en condiciones de polinización dirigida con polen de dos variedades de Citrus.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ASPECTOS GENERALES

2.1.1. Origen de los cítricos

Los cítricos se originaron en el sureste asiático, al sur de China y noreste de India y Burma (Khan, 2007). Se cree que la introducción de los cítricos como cultivo (domesticación) y el origen de varias especies tuvo lugar en China (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996). La introducción a América se dio por los españoles y portugueses en el siglo XVII (Agustí, 2010).

Se cree que todas las especies de citrus se originaron a partir de cruzamientos entre las tres especies “verdaderas”: *Citrus medica* (citron o cidro), *C. maxima* (pummelo) y *C. reticulata* (mandarino). La hibridación de *C. reticulata* y *C. maxima* dio lugar al naranjo amargo y dulce, y a su vez el cruzamiento entre *C. maxima* por naranjo originó el pomelo (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996).

2.1.2. Taxonomía

Las especies de cítricos cultivadas comercialmente en la actualidad pertenecen al género *Citrus* de la familia Rutaceae, subfamilia Aurantioideae (Khan, 2007). La subfamilia se caracteriza por poseer frutos de tipo baya llamados hesperidios, semillas sin endosperma y con uno o más embriones nucelares (apomícticos) (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996). En la subfamilia existen otros dos géneros, *Fortunella* y *Poncirus*, en este último la especie *Poncirus trifoliata*, de hoja caduca y resistente a bajas temperaturas tiene gran importancia para la producción ya que es ampliamente utilizado como portainjerto (Agustí, 2010).

2.1.3. Citricultura en el mundo

Actualmente el cultivo y producción de cítricos se extiende entre las latitudes 40° N y 40° S, abarcando climas variados, desde regiones tropicales, clima cálido-húmedo, a subtropicales, clima templado. La mayoría de las plantaciones comerciales se encuentran en climas subtropicales donde las estaciones están marcadas y el ciclo vegetativo y reproductivo se ve controlado por variaciones de las temperaturas, y en donde se logra mejor calidad de fruta (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996).

Los cítricos se cultivan en más de 100 países ocupando en el mundo una superficie aproximada de 9 millones de hectáreas. La producción de cítricos, que incluye naranjas, mandarinas, pomelos, limones y limas, alcanza anualmente más de 120 millones de toneladas, siendo los principales países productores China, Brasil y Estados Unidos (FAO. FAOSTAT, 2011).

2.1.4. Citricultura en el Uruguay

La citricultura es el principal rubro frutícola del país, con una superficie efectiva de 16.250 hectáreas y 7 millones de plantas. Las especies de cítricos plantadas son principalmente naranjas, mandarinas, limones y pomelos. Las naranjas ocupan la mayor superficie, 50 % del total, seguidas por las mandarinas, 38 %, y limones y pomelos que ocupan un 11 % y 1 % respectivamente. En promedio, la producción de cítricos ha sido de 300 mil toneladas en los últimos tres años (MGAP. DIEA, 2012).

El rubro se concentra en dos zonas de producción, la zona norte donde está el 85 % de la superficie efectiva y la zona sur, con el 15 % (MGAP. DIEA, 2012). Las zonas se diferencian en cuanto al mesoclima, importancia del rubro y tamaño y composición de la producción, siendo más importantes las naranjas, mandarinas y pomelos en la zona norte y la producción de limones en el sur.

El objetivo de la producción es la exportación de fruta para consumo en fresco, exportándose entre el 45 y 48 % de la producción, en los últimos años. Del total de mandarinas producidas en 2010, el 53 % fue exportado (MGAP. DIEA, 2010). Los principales destinos son países de la Unión Europea (Holanda y España), Brasil y Rusia (MGAP. DIEA, 2012). El resto de la producción se comercializa en el mercado interno e industria.

2.1.4.1. Variedad 'Afourer'

'Afourer' es una variedad originada de semilla, descubierta en 1982 en un monte de mandarino 'Murcott' en la ciudad de Afourer en Marruecos (Nadori, 2004). Se cree que es el resultado de un cruzamiento entre mandarino Murcott como madre y un donador de polen desconocido (U. S. Patent, 1998).

Se caracteriza por una rápida entrada en producción (15 a 20 t ha⁻¹ al tercer año), altos rendimientos (30 a 60 t ha⁻¹), alta capacidad partenocárpica y fruta de muy buena calidad interna y externa (Saunt 2000, Nadori 2004).

En nuestras condiciones la producción fue de 3245 toneladas en el 2012, con una productividad de 42 kg por planta (MGAP. DIEA, 2012).

El tamaño de la fruta es mediano y su forma no es perfectamente redonda, si no que está levemente achatada en la base y ápice. La piel es lisa, de color rojo-naranja y de fácil pelado. Presenta una coloración rosada en la cara interna de la cáscara (albedo) y un alto porcentaje de jugo (U. S. Patent, 1998).

Una de las características más relevantes es que produce frutos sin semillas en ausencia de polinización cruzada (U. S. Patent 1998, Saunt 2000, Nadori 2004, Chao 2005a, Gravina et al. 2011).

2.2. REPRODUCCIÓN EN LOS CÍTRICOS

2.2.1. Tipos de reproducción

La reproducción en los cítricos puede ser sexual o asexual. En la reproducción sexual, se forman células especializadas llamadas gametos y la fusión del gameto masculino y femenino lleva a la formación del embrión y posteriormente a la semilla. El otro tipo de reproducción presente en los cítricos es la apomixis, forma de reproducción asexual, en la cual la formación del embrión se da sin que tenga lugar la fecundación (Poehlman y Sleper, 2003).

Existen dos formas de apomixis, la embrionía adventicia y la apomixis gametofítica. En la primera, que es la forma que aparece en los cítricos, los embriones se desarrollan directamente de una célula nucelar. En el segundo caso, los embriones se generan de una oófera de un saco embrionario diploide (sin meiosis), originado a partir de una célula madre de la megáspora (apomixis diplosporia) o a partir de una célula nucelar (apomixis aposporia) (Poehlman y Sleper, 2003).

2.2.2. Floración

La floración es la primera fase del proceso reproductivo y culmina con la antesis. La misma, tiene lugar tras un largo período juvenil cuya duración depende tanto de las condiciones medioambientales como de la especie y la variedad.

Se inicia con la inducción floral y continúa con la diferenciación y maduración de los elementos florales.

Las condiciones climáticas, principalmente la temperatura y el aporte hídrico, regulan la inducción floral en los cítricos (Tadeo et al., 2003). En nuestras condiciones las bajas temperaturas otoñales e invernales son las que promueven la inducción floral, teniendo en general una única floración al año, en primavera. En condiciones tropicales el estrés hídrico es el principal factor controlando la inducción floral, presentándose varios ciclos de floración al año (Gravina, 1999).

Dentro de los factores endógenos que inhiben la inducción floral, varios autores reportan la carga de fruta como uno de los principales. La acción de estos puede ser a través de un efecto nutricional, reduciendo la acumulación de reservas previa a la diferenciación floral, o a través de la inhibición de la floración provocada por la síntesis de giberelinas (Agustí et al., 2003b). La carga de fruta inhibe la floración reprimiendo la expresión de los genes de inducción *CiFT* y *SOC1* (Muñoz-Fambuena et al., 2011). Muñoz-Fambuena et al. (2012) encontraron una alta correlación entre la aplicación de ácido giberélico (GA_3) y la represión del gen de inducción (*CiFT*) en naranjo dulce. La aplicación de GA_3 en el período de inducción floral, disminuye significativamente la expresión del gen, y por el contrario la aplicación de paclobutrazol (inhibidor de la síntesis de giberelinas) aumenta la expresión, y el número de flores diferenciadas por brote.

La diferenciación de la yema floral implica una serie de cambios morfológicos en la anatomía del meristemo vegetativo que consiste en el ensanchamiento y alisamiento de su porción apical (Lord y Eckard, 1985). La formación de órganos florales se da en forma acrópeta, primero se forman los verticilos externos, sépalos y pétalos y luego los estambres y los carpelos.

La antesis constituye el final de la floración y, al mismo tiempo, marca el inicio de la segunda fase del proceso reproductivo, la fructificación.

2.2.2.1. Morfología y anatomía de la flor

La flor de cítricos presenta un cáliz de 5 sépalos y una corola de 5 pétalos blancos, dispuestos sobre el receptáculo alternados entre sí. Los pétalos envuelven directamente a los órganos propiamente reproductivos, el androceo y el gineceo (Spiegel-Roy y Goldschmidt 1996, Tadeo et al. 2003).

El androceo es el verticilo masculino de la flor y está compuesto por 20 a 40 estambres, dependiendo de la variedad, parcialmente unidos en la base. Se diferencian en el meristemo floral una vez que lo han hecho los sépalos y los pétalos. Cada estambre está formado por un filamento y por una antera, que consta de dos tecas bilobulares. En cada lóbulo de las tecas jóvenes se encuentran los sacos polínicos que contienen las micrósporas.

Los estambres rodean al gineceo, que corresponde al verticilo femenino y está formado por el estigma, el estilo y el ovario.

El estigma es la estructura de la flor de los cítricos específicamente preparada para la polinización y germinación del grano de polen. Está ubicado en el extremo del estilo y puede dividirse en dos zonas. Una zona superficial de tipo glandular, formada por papilas (zona estigmática), y una zona interior no glandular, formada por células parenquimáticas (zona estigmateoide), la cual envuelve los tejidos conductores, los canales estilares, y que se continúa en el estilo constituyendo la corteza (Tadeo et al., 2003).

Su receptividad comienza unos pocos días antes de la antesis, y en algunos casos puede continuar por 6-8 días (Randhawa et al., citados por Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996). Mesejo et al. (2007b) observaron que el estigma de flores de mandarina 'Clementina de Nules' y naranjo 'Valencia', polinizadas con polen de 'Fortune', se mantuvo receptivo durante 10 días después de antesis.

El estilo, que une el estigma con el ovario, es cilíndrico y dentro de él se encuentran los canales estilares desde cada lóculo hasta la superficie del estigma (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996). Anatómicamente, el estilo se divide en tres zonas: (a) la epidermis, formada por una capa de células parenquimáticas de estructura rectangular, con una pared periclinal externa recubierta de una gruesa cutícula, (b) la corteza, formada por varias capas de células de naturaleza parenquimática, que envuelve los haces vasculares y los

canales estilares, y (c) las células de los canales estilares, de naturaleza glandular, que producen y liberan una secreción al canal (Tadeo et al., 2003).

Las papilas del estigma y células alrededor de los canales estilares producen y secretan un exudado compuesto por azúcares, lípidos y proteínas, que el grano de polen utiliza para hidratarse, germinar y como medio nutritivo para poder mantener el crecimiento del tubo polínico. La secreción comienza antes de la antesis, y continúa hasta la caída de pétalos. En la antesis se secreta el mayor volumen de exudado. La secreción se produce por la degradación del almidón almacenado en los amiloplastos (Tadeo et al. 2003, Distefano et al. 2011).

El ovario contiene un número variable de carpelos, de 8 a 14, fusionados entre sí que rodean su eje central. Cada carpelo encierra un lóculo, en cuyo ángulo interno se encuentran adheridos de 4 a 5 óvulos (placentación axial). Los óvulos son anátropos, con el micrópilo dirigido hacia el eje del ovario donde termina el canal estilar. Están formados por el funículo, la nucela, el saco embrionario y los tegumentos (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996).

La nucela es un tejido parenquimático interno del óvulo y contiene el gametofito femenino o saco embrionario. Está envuelta por dos tegumentos, externo e interno, que dejan una abertura llamada micrópilo por donde penetran los tubos polínicos. La chalaza es la región donde convergen los tegumentos con el funículo, que es una especie de pedúnculo que une el óvulo a la placenta. Por el funículo pasa un haz vascular que llega hasta la chalaza y se encarga de nutrir a la nucela, y es una ramificación de los haces vasculares localizados en el eje central del ovario (Tadeo et al., 2003).

En la base del ovario, por encima de los puntos de unión de los estambres, se encuentra el disco nectarífero, el cual secreta una gran cantidad de néctar acuoso en el momento de antesis (Schneider, citado por Tadeo et al., 2003). Esta secreción se prolonga durante al menos 48 horas después de la antesis y es capaz de atraer a las abejas responsables de la polinización cruzada en cítricos (Vansell et al., citados por Tadeo et al., 2003).

El primer síntoma externo de senescencia del conjunto estigma-estilo, es la aparición de un anillo de tonalidad más clara que se localiza por encima de la zona de unión entre el estilo y el ovario (Tadeo et al., 2003).

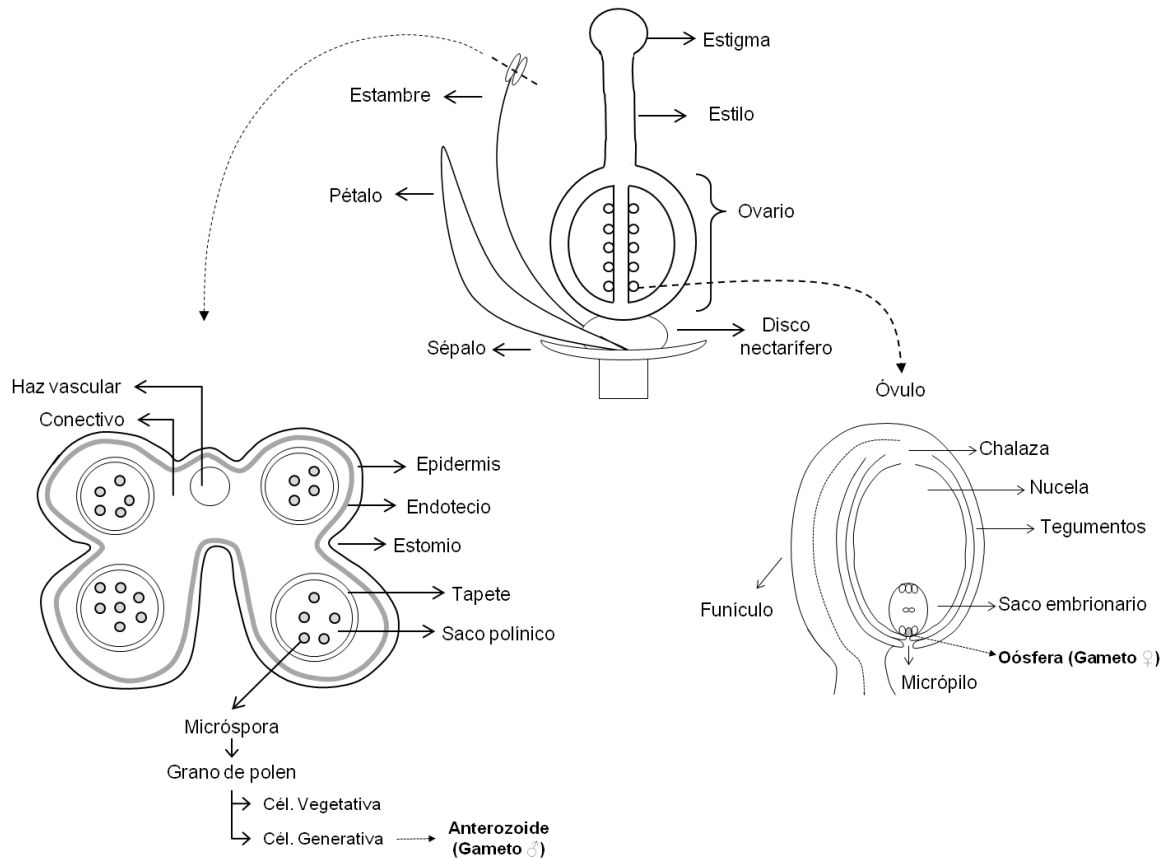


Figura 1. Esquema de la morfología de la flor de cítricos, microesporangio y megasporangio, adaptado de UdelaR (URUGUAY). FA (2010).

2.2.2.2. Desarrollo de gametos femeninos

Antes de que se desarrollen los tegumentos del óvulo, se destaca en su interior una célula hipodérmica en la zona micropilar por su mayor tamaño y núcleo más prominente. La misma se denomina célula arqueosporica, y luego de una división mitótica da lugar a la célula madre de la megáspora.

La célula madre de la megáspora crece varias veces y se elonga, y por meiosis da lugar a cuatro megásporas. Las mismas se disponen longitudinalmente en la nucela, y solo la inferior (más cerca de la chalaza) continúa su desarrollo, el resto degenera.

A medida que la megáspora crece, su núcleo se divide por mitosis resultando en dos núcleos hijos, que se desplazan al extremo opuesto del saco embrionario. Cada núcleo se divide dos veces más, quedando en total 8 núcleos en el saco. Tres de ellos quedan en la zona de la chalaza, denominadas células antipodales, y dos en la parte central, llamados núcleos polares. Los restantes quedan en la zona del micrópilo, denominándose a la de los extremos células sinérgidas y oófera a la del centro (Figura 1). El saco embrionario queda formado por cinco células vegetativas (las antipodales y sinérgidas), una célula media (la fusión de los núcleos polares) y la célula gamética (oófera).

2.2.2.3. Desarrollo de gametos masculinos

Antes de que la célula madre de la megáspora pase la profase de la primera división (meiosis I), las micrósporas se empiezan a desarrollar en granos de polen (Osawa, citado por Frost y Soost, 1968).

En la zona hipodérmica de los micrósporangios, se distinguen las células arqueosporicas por un mayor tamaño de núcleo, las que forman el tejido arqueosporico. El mismo, luego de varias divisiones forma células parietales y esporogéneas. Divisiones de las células parietales forman el tapete, mientras que la célula esporogénea se divide formando células madres de la micróspora.

Las micrósporas crecen y desarrollan dos capas, la exina e intina. Antes de la dehiscencia de la antera, las micrósporas se dividen mitóticamente formando dos núcleos adyacentes, uno vegetativo, de mayor tamaño, y uno generativo. Una vez formados ambos núcleos, queda constituido el grano de polen. El núcleo vegetativo es el que forma el tubo polínico, mientras que por mitosis el núcleo generativo forma dos anterozoides (gametos masculinos) (Frost y Soost 1968, Talón et al. 2003).

2.2.3. Polinización

La polinización es la transferencia de granos de polen de la antera al estigma. Cuando el polen de una flor es transportado al estigma de la misma, o de una flor de la misma planta o clon de la variedad se denomina autopolinización. Sin embargo, cuando es transportado al estigma de una flor de otra variedad o especie, diferente genéticamente, se denomina polinización cruzada (Frost y Soost 1968, Abros 2012).

El polen es trasladado de diferentes maneras al estigma, puede ser por contacto directo entre las anteras y el estigma, transportado por viento o mediante insectos (Frost y Soost, 1968). Se denomina polinización anemófila cuando el polen es transportado por el viento, y entomófila cuando es a través de insectos.

Los cítricos presentan polen pesado y viscoso difícilmente transportado por el viento, pero que fácilmente se adhiere al cuerpo de los insectos, por lo que la polinización es principalmente entomófila, siendo las abejas melíferas los principales polinizadores. Las flores de los cítricos presentan cuatro características que las hacen atractivas para los insectos: corola vistosa, fuerte perfume, su polen y abundante néctar (Frost y Soost, 1968).

En el momento de la antesis, el estigma es receptivo a los granos de polen, ya maduros en las anteras y puede comenzar la polinización. Una vez que el grano de polen alcanza el estigma, se hidrata gracias a las secreciones estigmáticas y germina emitiendo el tubo polínico. El tubo polínico penetra en el estigma y desciende por el estilo hasta alcanzar los lóculos del ovario siguiendo el camino marcado por los canales estilares. Sin embargo, también pueden crecer a través de los espacios intercelulares del tejido estilar. Este camino exige constantes cambios en la dirección de crecimiento del tubo polínico que están marcados por una fuerte deposición de calosa (Distefano et al., 2011)

2.2.3.1. Período de polinización efectiva

Para que la polinización sea efectiva, el grano de polen tiene que ser trasladado al estigma, germinar y llegar al óvulo maduro, mientras esté todavía viable (Sozzi, 2007).

El período de polinización efectiva, es la diferencia entre el tiempo de viabilidad del óvulo después de la antesis, y el tiempo necesario para que el polen germine y crezca por el estilo hasta alcanzar el óvulo (Williams, 1965).

Está determinado por la receptividad del estigma, el crecimiento del tubo polínico y la longevidad del óvulo. Condiciona la fecundación, y por lo tanto la presencia de semillas en los frutos (Mesejo, 2007a).

2.2.3.2. Factores que afectan la polinización

La polinización y consiguiente fecundación puede verse afectada por factores ambientales, hormonales y nutricionales. Dentro de los factores ambientales, la temperatura y humedad relativa son los más importantes (Sozzi 2007, Agustí 2010).

La temperatura puede afectar la polinización de forma indirecta, sobre la eficacia de las abejas o directamente sobre la germinación de los granos de polen, crecimiento de los tubos polínicos y longevidad del óvulo (Sozzi 2007, Agustí 2010).

La eficacia de las abejas en el transporte de polen es máxima para una temperatura media de 20-22 °C, y prácticamente nula cuando es inferior a 12 °C. A su vez el viento y las lluvias dificultan el vuelo de las abejas, disminuyendo su eficacia como polinizadora (Agustí, 2010).

Estudios realizados por Chao et al. (2005a), revelan que la distancia máxima que son capaces de recorrer los insectos polinizadores para fecundar una flor, llevando consigo polen de distintas variedades que suelen encontrar en su recorrido, es de 960 metros. Con estas distancias se hace difícil evitar el cruzamiento entre variedades compatibles, y la consiguiente presencia de semillas en variedades autoincompatibles.

La germinación del grano de polen y crecimiento del tubo a lo largo del estilo se ve favorecido por temperaturas elevadas (25-30 °C) y reducidos o totalmente inhibidos cuando éstas son bajas (<20 °C) (Agustí, 2010).

Pardo et al. (2010) encontraron que las bajas temperaturas durante el proceso de formación de flores en limón 'Fino' y naranja 'Sucreña', disminuía el

poder germinativo del polen, y que la sensibilidad al frío variaba según el genotipo (limón 'Fino' más susceptible que naranja 'Sucreña').

El estado fenológico en que se dan las bajas temperaturas también afecta el poder germinativo del polen. La viabilidad del polen está más relacionada a las temperaturas alcanzadas en los estadios 55 y 56 (botón verde y blanco de la escala BBCH) que las registradas durante toda la floración (Pardo et al., 2010).

La reducción de la viabilidad de polen a causa de las bajas temperaturas podría explicarse por el efecto negativo de éstas sobre la meiosis, que se da en esos estadios (Koltunow et al., 1995). Posiblemente dificultan el apareamiento de los cromosomas, favoreciendo la esterilidad de los gametos y la malformación del polen (Pardo et al., 2010).

Distefano et al. (2012) no observaron germinación de polen *in vitro* a temperaturas menores a los 10 °C, en pummelo, mandarino 'Dancy', citrón y Clementina. A 15 °C, fue menor al 10 % (excepto en Clementina que seguía sin germinar), y a 20 °C se diferenció significativamente para cada genotipo, de 3 % en Clementina y hasta 20 % para citrón y pummelo. El aumento de la temperatura, en el rango de 15 a 25 °C, fue acompañado por un aumento del porcentaje de germinación de polen, siendo el máximo a 25 °C, y disminuyendo a 30 °C (excepto para Clementina).

La capacidad de formar semillas, disminuye solo cuando las temperaturas son notoriamente bajas y superan el nivel de sensibilidad de cada variedad.

Durante siete años, en dos clones de mandarina 'Murcott', se midió la temperatura a las que habían estado sometidas las flores durante el período de floración y el número de semillas formadas. Se determinó una alta correlación con la temperatura media mínima, siendo evidente que las bajas temperaturas influían negativamente en la cantidad de semillas (Pardo et al., 2010).

Valores de humedad relativa bajos (<50 %) han demostrado ser negativos para la fecundación en algunas especies, al reducir la retención del grano de polen en el estigma, mientras que valores elevados (>90 %) pueden dificultar la dehiscencia de las anteras o reducir la fijación del polen en el estigma (Agustí, 2010).

2.2.4. Fecundación

En los lóculos, los tubos polínicos llegan al saco embrionario a través del micrópilo, donde un anterozoide (n) se fusiona con la oófera (n) formando el cigoto ($2n$). El otro anterozoide se fusiona con los núcleos polares ($2n$) formando el endosperma ($3n$).

El endosperma es de vital importancia para el desarrollo del embrión, y desaparece junto con la nucela, a medida que éste crece. El mismo acumula almidón durante el crecimiento, dada la fuerza fosa que le da el embrión (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996).

2.2.4.1. Formación de semillas

La semilla de los cítricos está formada por dos cotiledones y puede ser mono o poliembriónica, pudiendo contener de 1 a 7 embriones (Frost y Soost, 1968). Solamente uno de los embriones deriva de la fusión sexual, siendo el resto embriones nucelares e idénticos genéticamente a la planta madre. Por lo tanto, en una misma semilla existen embriones con carga genética diferente (Tadeo et al., 2003).

2.2.5. Cuajado y fructificación

La fructificación es el proceso mediante el cual el ovario crece y se desarrolla hasta convertirse en un fruto maduro, tanto fisiológicamente como comercialmente (Tadeo et al., 2003).

El cuajado está definido en sentido estricto, como el reinicio del crecimiento del ovario, posterior a la antesis, y en un sentido amplio, es el período en el cual el fruto puede sufrir abscisión. El cuajado y desarrollo inicial del fruto depende de factores endógenos y exógenos (Gravina, 1999).

La competencia establecida entre el número de flores en desarrollo, es uno de los factores endógenos determinantes. En la mayoría de las variedades cultivadas, el bajo porcentaje de cuajado sólo se presenta con alta intensidad de floración. La planta es incapaz de nutrir a todos los ovarios que inician el desarrollo y la mayor parte de éstos abscisionan.

Una medida para mejorar el cuajado es reducir la intensidad de floración, con aplicaciones de GA₃ durante el proceso de inducción floral (otoño-invierno). Esta reducción de la brotación, viene acompañada de una redistribución del tipo de brote, aumentando el porcentaje de brotes de flores con hoja (que presentan mayor cuajado), y reduciendo los generativos, lo que explica conjuntamente el incremento de frutos que llegan a cosecha (Agustí et al., 2003b).

El hecho de que variedades con una capacidad similar de cuajado, con y sin semillas, tengan contenidos semejantes de giberelinas (Talón et al., 1990) indica que estas hormonas deben ser responsables del cuajado en los cítricos. El mecanismo ha sido estudiado comparativamente en la mandarina Satsuma (especie con esterilidad gamética masculina) con alto grado de partenocarpia natural, y en mandarina Clementina (autoincompatible) con baja capacidad partenocárpica (Talón et al., 1992). Los estudios comparativos entre estas dos variedades demostraron que, la elevada capacidad partenocárpica en Satsuma se asocia a altos contenidos endógenos de giberelinas en los ovarios en desarrollo, mientras que la reducida capacidad de cuajado en Clementina se asocia a contenidos bajos.

La aplicación exógena de esta hormona incrementa el cuajado en la mandarina Clementina, pero no tiene ningún efecto sobre Satsuma (Talón et al., 1992), y la inhibición de la síntesis de giberelinas inducida por el paclobutrazol, provoca abscisión en ambas variedades (Agustí et al., 2003b).

La aplicación de GA₃ a las variedades de bajo índice partenocárpico, se ha desarrollado cómo una técnica eficaz para mejorar el cuajado (El-Otmani et al., 2000). El efecto de la aplicación en primavera es eficaz en variedades que naturalmente son más productivas, no así en variedades como el híbrido 'Ellendale' y 'Nova' que presentan un bajo cuajado natural (Gravina et al. 1994, Gambetta et al. 2008), lo que estaría explicando un efecto diferencial por factores ajenos al contenido endógeno de giberelinas. Por lo tanto, la aplicación de GA₃ incrementa el número de frutos que inician el desarrollo, pero si éste es muy elevado, como consecuencia de una floración intensa, la abscisión no se evita, solo se retrasa (Gambetta et al., 2008). En cambio, si el número de flores es reducido, la competencia es baja y con la aplicación de GA₃, el número de ovarios que inician el desarrollo aumenta y se mantienen hasta la cosecha (Agustí et al., 2003b).

Talón et al. (2001) probaron la aplicación exógena de GA₃ en plantas enteras y en flores individuales en un grupo de variedades. Las únicas que respondieron favorablemente con una mejora del cuajado fueron el grupo de las clementinas ('Clementina de Nules', 'Clementina Fina' y 'Clementina Oronules'). En tanto las restantes variedades probadas, Satsumas, grupo de naranja Navel, e híbridos como 'Ellendale', 'Fortune', 'Nova', 'Ortanique' y el tangelo 'Minneola', no presentaron respuesta a la aplicación de GA₃.

Otra medida eficaz para aumentar el número de frutos que llegan a la madurez, es la técnica de anillado de tronco o ramas principales (Agustí et al., 1992). Consiste básicamente en realizar un marcado del tronco de no más de 1 mm de profundidad, afectando solamente el transporte por el floema. Esto permite que mientras se da la cicatrización y se reanuda la conexión vascular, un mayor contenido de carbohidratos queda momentáneamente acumulado en hojas y ramas, y más disponibles para los frutos en desarrollo. Se ha encontrado en nuestro país un efecto significativo en la mejora del cuajado con esta práctica a distintas intensidades de floración, en el tangor 'Ellendale' y naranja 'Salustiana' (Gravina, 1999).

Al igual que en el caso de aplicación de giberelinas, el anillado de tronco en condiciones de muy elevada floración es poco eficiente en promover el cuajado, lo que indica que la elevada competencia entre órganos en desarrollo es la principal causa de abscisión de frutos.

Dentro de los factores externos que regulan el proceso de cuajado de los frutos, se han reportado las condiciones de alta temperatura, alta radiación y/o estrés hídrico como las principales limitantes. En nuestras condiciones, se ha encontrado para la zona norte que la acumulación de horas con temperaturas mayores a 30 °C, produjo una caída importante de frutos en el tangor 'Ortanique' (Fasiolo et al., 2010).

Los cítricos tienen una tasa de asimilación neta de CO₂ relativamente baja con respecto a otros frutales, y un punto de saturación también bajo, en el rango de 700-900 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, aproximadamente un tercio de la luz total. En ambientes de alta luminosidad la temperatura de hoja puede elevarse hasta 9 °C por encima de la temperatura del aire y esto provoca un aumento en el déficit de presión de vapor (hoja-aire), que resulta en una disminución de la conductancia estomática y la tasa de asimilación de CO₂ (Syvertsen et al., 2003). Condiciones de alta radiación, en presencia de otro

factor de estrés, como por ejemplo un déficit hídrico prolongado, pueden dar lugar a procesos de fotoinhibición, es decir disminución en la fotosíntesis por saturación de luz.

El estrés hídrico en la etapa de cuajado puede provocar fuerte caída de frutos, esto es debido a que en respuesta al estrés, se acumula ácido abscísico (ABA) y ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) en raíces y en frutos, lo cual es la señal primaria que luego modula los niveles de etileno, activador hormonal de la abscisión (Gómez-Cadenas et al., 1996).

2.3. PARTENOCARPIA

La formación de frutos sin que exista fecundación previa se denomina partenocarpia y se caracteriza por la ausencia de semillas.

La partenocarpia puede clasificarse en obligatoria, cuando siempre se producen frutos sin semillas, y facultativa cuando la ausencia de semillas se produce solo si se previene la polinización. A su vez puede clasificarse en partenocarpia vegetativa, cuando no requiere el estímulo de la polinización para producir fruta, y estimulativa cuando lo requiere. La estenospermocarpia, es cuando se desarrollan frutos con semillas parcialmente formadas, debido al aborto de los embriones luego de la fecundación (Vardi et al., 2008).

La partenocarpia en citrus tiene una base genética y se asocia a los niveles de las fitohormonas que promueven el crecimiento del fruto (Vardi et al., 2008).

Mesejo et al. (2013), demostraron que la partenocarpia en dos variedades de Clementinas ('Marisol' y 'Clemenules'), es independiente al estímulo de la polinización y su habilidad de cuajar depende de los niveles hormonales en el ovario. Esto último coincide con estudios anteriores que demuestran que el cuajado de frutos partenocárpico está asociado a altos niveles endógenos de auxinas y giberelinas en el ovario (Vardi et al., 2008).

La partenocarpia es el primer requisito para la producción de frutos sin semillas. Combinado con diferentes tipos de esterilidad, es la forma más eficiente de producir frutos sin semillas en citrus.

2.4. ESTERILIDAD Y COMPATIBILIDAD

El termino esterilidad indica la incapacidad reproductiva mediante gametos. La esterilidad junto a la partenocarpia son necesarias para la producción estable de fruta sin semilla (Khan, 2007). La completa ausencia de semillas, bajo todas las condiciones, es rara en las variedades de citrus (Frost y Soost, 1968).

Los factores ambientales pueden provocar el cuajado partenocárpico, pero es la esterilidad de origen genético (gamética, homogenética o citológica), la principal responsable de esta alternativa a la fecundación (Agustí et al., 2003b).

La esterilidad gamética puede ser relativa o absoluta. La esterilidad gamética relativa representa tanto la autoincompatibilidad gamética, incapacidad de producir embriones por autopolinización aunque los gametos sean viables, como la incompatibilidad cruzada (ciertos apareamientos son incapaces de producir embriones aunque los gametos sean funcionales en otros cruzamientos) (Frost y Soost, 1968).

En el caso de la autoincompatibilidad, el grano de polen germina al entrar en contacto con el exudado del estigma y comienza el crecimiento del tubo polínico; sin embargo, este no progresa más allá de las papilas estigmáticas y, morfológicamente, presenta deposiciones irregulares de calosa (Kahn y DeMason, 1988).

Un ejemplo de este tipo de esterilidad es el mandarino 'Clementina de Nules', en el cual el crecimiento de los tubos polínicos no progresa más allá del extremo apical del estilo cuando se fuerza la autopolinización en el estado de flor abierta o anthesis (Pérez-Botella et al., 1997).

La esterilidad gamética absoluta puede ser masculina (incapacidad para producir polen funcional) o femenina (incapacidad para producir sacos embrionarios).

Dos ejemplos de esterilidad gamética masculina son el naranjo dulce 'Washington' navel (*Citrus sinensis* L. Osbeck) y la mandarina Satsuma (*Citrus unshiu* Marc.). En las naranjas del grupo navel se diferencian las células madres de polen, pero luego degeneran antes de dividirse y, por lo tanto, no se produce polen maduro y viable en las anteras (Frost y Soost, 1968). En

Satsuma la esterilidad se debe a un bajo número de células madres y/o a la degeneración de las mismas en distintas etapas de su desarrollo, resultando en pocos granos de polen funcional en floración (Osawa, citado por Iwamasa, 1966).

En estas dos variedades puede presentarse la esterilidad gamética femenina en donde la célula madre de la megáspora muchas veces degenera luego de la formación de la fila de megásporas (Osawa, citado por Iwamasa, 1966). Algunos sacos embrionarios alcanzan la madurez y contienen gametos capaces de fecundación (Frost y Soost, 1968).

Se denomina esterilidad homogenética cuando los gametos son fértiles, sin embargo, aparecen mecanismos de incompatibilidad, asociados a sistemas de reconocimientos genético polen-pistilo, que interfieren en el desarrollo del tubo polínico impidiendo la fecundación, pudiendo ser gametofítica o esporofítica.

En el sistema gametofítico, el ritmo del crecimiento del tubo polínico es controlado por una serie de alelos múltiples que se denominan S_1, S_2, \dots, S_n . El núcleo del polen es haploide y tiene solo un alelo de incompatibilidad, mientras que el tejido estilar es diploide y posee dos alelos. Si el alelo de incompatibilidad del polen es idéntico a uno de los dos alelos del tejido estilar el crecimiento del tubo se retrasa y la fecundación rara vez ocurre (Poehlman y Sleper, 2003).

El polen es capaz de germinar en el estigma de la flor, pero en el estilo comienzan a sintetizarse RNA-asas que penetran en el tubo polínico y descomponen su RNA, deteniendo su crecimiento (McClure et al., 1990).

En el sistema esporofítico el polen es incapaz de germinar en el estigma, dada la síntesis de enzimas quinasas que impiden su germinación (Nasrallah et al., 1994).

El sistema de autoincompatibilidad en citrus parece ser del tipo gametofítico, mientras que la esterilidad masculina y femenina se debe a genes de esterilidad, anomalías cromosómicas y triploidía (Khan, 2007). Fornero et al. (2012), encontraron que la autoincompatibilidad en mandarina 'Afourer' (*Citrus reticulata* Blanco) es del tipo gametofítica, ya que los granos de polen

germinan en su propio estigma pero el crecimiento de los tubos polínicos se detiene en la primera parte del estilo.

Por último en la esterilidad citológica se producen alteraciones cromosómicas en la división celular durante la gametogénesis, que hacen disminuir la capacidad germinativa del polen. Este tipo de esterilidad no impide el desarrollo del fruto, pero sus semillas no pasan de ser rudimentos seminales, como sucede en manzanos y perales.

Ejemplos de este tipo de esterilidad son el naranjo dulce 'Valencia' en donde la translocación recíproca (intercambio de segmentos entre dos cromosomas no homólogos) es la principal causa de esterilidad. La esterilidad parcial, presente en lima mexicana es causada por la inversión de un fragmento del cromosoma, que se incorpora de nuevo a él, pero en orientación inversa (Iwamasa, 1966). En el pomelo 'Marsh', la esterilidad se debe a fallas que no permiten que se forme correctamente el huso meiótico (Raghuvanshi, citado por Khan, 2007).

2.5. CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE FRUTOS

El fruto de los cítricos es un tipo de baya, denominado botánicamente hesperidio, cuya parte exterior es relativamente rígida y la interna, la parte comestible, está dividida en segmentos o gajos.

La porción más externa de la piel, coloreada, se denomina flavedo y la interna, generalmente blanca, se denomina albedo. El flavedo está formado por células de naturaleza parenquimática densamente empaquetadas en el tejido. El albedo está compuesto también por células parenquimáticas aunque débilmente empaquetadas y con grandes espacios intercelulares entre ellas que le confieren a este tejido una apariencia esponjosa.

La porción interna del fruto se denomina pulpa y está compuesto por segmentos o gajos, que rodean el eje central del fruto. El número y tamaño de los segmentos es característico de cada especie y variedad. Los segmentos están compuestos por septos que envuelven a las vesículas, en donde se almacena el jugo y las semillas.

El crecimiento y desarrollo del fruto de los cítricos, medido en tamaño o en peso, sigue una curva de crecimiento sigmoide que puede dividirse en tres fases.

La fase I, se caracteriza por un crecimiento exponencial y su duración va desde antesis hasta fin de caída fisiológica. En esta fase, el crecimiento es rápido debido a una alta división celular promovida por giberelinas y citoquininas. Los frutos durante esta fase soportan dos periodos de abscisión. El primero implica a flores y se produce por la zona situada entre el pedúnculo y el tallo; en el segundo período los frutos abscisionan por la región de unión entre el disco floral y el ovario. En general, la mayor parte de los frutos que sobrepasan este segundo periodo de abscisión permanecen en el árbol hasta la cosecha (Spiegel-Roy y Goldschmidt 1996, Agustí 2003a).

La fase II, corresponde a un crecimiento lineal, y su duración se extiende por varios meses desde el final de la caída fisiológica hasta poco antes del cambio de color. En esta fase predomina la elongación celular (promovida por giberelinas y auxinas), y el incremento en tamaño del fruto se debe al crecimiento de la pulpa. Las vesículas de jugo alcanzan su máxima longitud y llenan los gajos ejerciendo una fuerte presión sobre la piel del fruto.

En la fase III, se dan los cambios relacionados al proceso de maduración y en ésta la tasa de crecimiento del fruto es mínima. En el flavedo sobrevienen la degradación de la clorofila y aumenta la síntesis de carotenoides, ambos procesos coinciden normalmente con la maduración interna, si bien están sujetos a controles distintos. Internamente aumenta el contenido de sólidos solubles, fundamentalmente azúcares y compuestos nitrogenados, mientras que los ácidos libres disminuyen progresivamente como consecuencia de un proceso de metabolización y dilución (Agustí 2003a, Tadeo et al. 2003).

2.5.1. Factores que afectan el crecimiento de frutos

Dentro de los factores internos que determinan el tamaño final del fruto, se destacan los factores genéticos de cada variedad, la posición del fruto en el brote y la competencia entre órganos en desarrollo.

La presencia de hojas en el brote estimula el desarrollo del fruto a través de una mayor velocidad de crecimiento. En este caso las hojas jóvenes adquieren un papel importante como fuente de asimilados. Las diferencias en tamaño final de frutos se inician en los estados más precoces del desarrollo del ovario (DaCunha Barros y Gravina, 2006). Éstas se deben a un mayor contenido hormonal (giberelinas y citoquininas) de los ovarios situados en

brotos con hojas, lo que podría aumentar la capacidad de estos frutos para atraer nutrientes del resto de la planta.

Uno de los factores más importantes que incide en el tamaño final del fruto, es la competencia entre órganos en desarrollo. Cuanto mayor es el número de órganos en desarrollo, ya sean flores o frutos, mayor será la competencia entre ellos por carbohidratos y minerales, lo que termina limitando su posibilidad de crecimiento (Agustí et al., 2003b).

El tamaño individual de cada fruto está inversamente relacionado al número total de frutos en el árbol.

Otro de los factores que se ha estudiado como promotor del crecimiento del fruto en variedades autoincompatibles, es la presencia de semillas producto de la polinización cruzada. Chao (2005b) afirma que existe una correlación positiva entre el diámetro y número de semillas por fruto. Pardo et al. (2010) encontraron una mayor proporción de frutos de mandarina 'Afourer' con 0 a 1 semilla en los diámetros menores a 60 mm, que en aquellos entre 60-70 mm y mayores a 70 mm. En estos últimos rangos, la mayoría de frutos presentaba más de 3 semillas, lo que deja en evidencia la importancia de éstas, probablemente a través de los factores hormonales, en el desarrollo del fruto.

Dentro de los factores exógenos, la disponibilidad hídrica es uno de los más relevantes. El suministro de agua en cantidades insuficientes provoca reducción del tamaño final del fruto, mientras que riegos con cierta frecuencia logran aumentarlo significativamente (Agustí, 2003a).

Las deficiencias en elementos minerales alteran el desarrollo de las plantas en un sentido amplio, por lo que el crecimiento del fruto también puede verse afectado. El efecto de estas deficiencias sobre el tamaño y calidad del fruto, son variables, y depende del elemento mineral en cuestión y del momento en que ocurra.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

El trabajo se realizó en un cuadro de mandarina ‘Afourer’ (*Citrus reticulata* Blanco) injertado sobre *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., plantado en el 2008 con un marco de plantación de 5 m x 2 m, en el establecimiento “El Espinillo” (Punta Espinillo, Montevideo). Se realizaron dos experimentos, el primero en el año 2010 y el segundo en el año 2011.

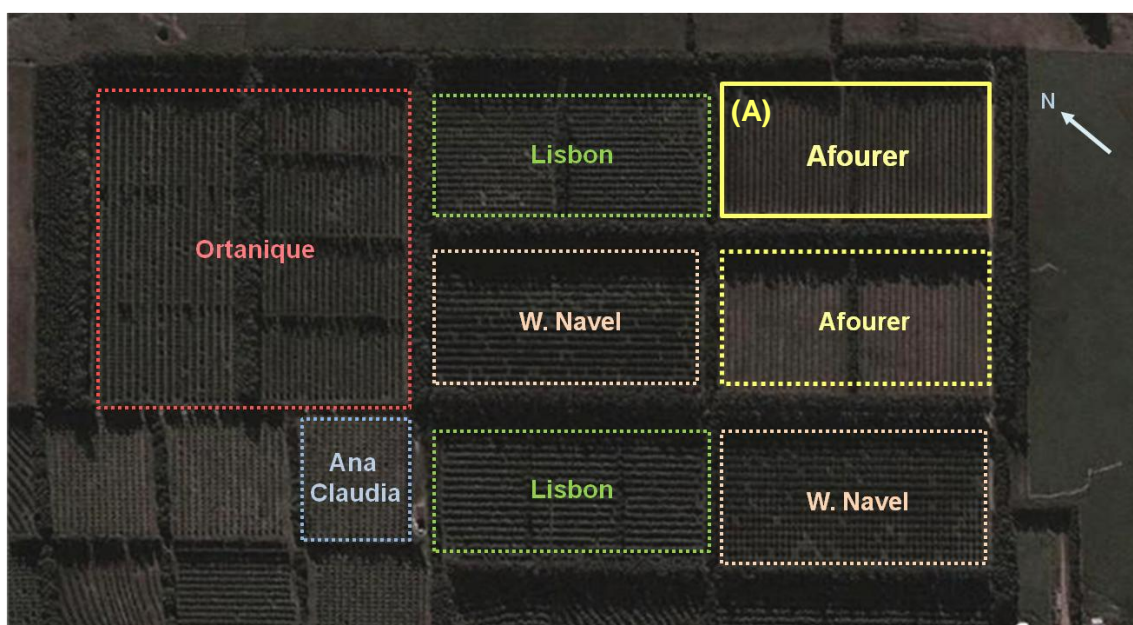


Figura 2. Foto aérea del cuadro de mandarina ‘Afourer’ utilizado (A) y variedades cercanas.

3.2. EXPERIMENTO 1

En la primera parte de este experimento se marcaron 300 brotes de flor terminal en estado 59 de la escala BBCH (Agustí et al., 1997), (Figura 2-A). A 200 de estos brotes se los emasculó y polinizó artificialmente, 100 con polen de limón tipo ‘Lisbon’ y 100 con polen del tangor ‘Ortanique’, manteniéndose los restantes 100 brotes en condición de libre polinización.



Figura 3. Estado botón alargado (A), Flor emasculada (B) Polinización manual de la flor (C), Flor embolsada (D).

La elección de estas dos variedades se hizo en base a la cercanía de la fuente de polen para el cuadro en estudio.

El polen fue colectado el mismo día de la polinización, de anteras maduras liberando polen. Previo a la polinización, las flores fueron emasculadas eliminando los estambres (Figura 3-B). Las polinizaciones se realizaron con un pincel fino, cubriendo el estigma con el polen colectado (Figura 3-C).

Luego de polinizados, los brotes se mantuvieron embolsados con malla tipo tul hasta la caída de pétalos (Figura 3-D), para evitar la llegada de polen diferente al que se aplicó manualmente mientras el estigma estuviera receptivo.

A partir de la caída de pétalos, se inició un seguimiento del cuajado y diámetro ecuatorial de los frutos, cada 15 días hasta la cosecha comercial. El cuajado final se determinó evaluando presencia o ausencia de los frutos en los brotes marcados, y el diámetro fue medido con calibre digital. En la cosecha se evaluó el número de frutos que presentaban semillas, el número medio de semillas por fruto y diámetro final de fruto.

El porcentaje de cuajado y frutos con semillas se analizó estadísticamente con un modelo lineal generalizado en el programa estadístico INFOSTAT (versión 2013) interfase con R (versión 3.0.1), y se utilizó el test DGC para la separación de medias. El número medio de semillas por fruto se analizó mediante un análisis de varianza. La separación de medias se hizo por test de Tukey.

En la segunda parte del experimento, y con el fin de evaluar la viabilidad de óvulos, se marcaron 54 brotes de flor terminal (estado 59 de la escala BBCH), a los cuales se les aplicó los mismos tratamientos de polinización: 18 flores fueron polinizadas con limón tipo 'Lisbon', 18 con 'Ortanique' y 18 quedaron en libre polinización.

Las fechas de colecta de flores fueron en los días 7, 13 y 17 post anthesis. Las flores se fijaron en una solución de FAA (5 % formol aldehído, 5 % ácido acético, 90 % etanol al 70 %) y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

3.3. EXPERIMENTO 2

Se marcaron un total de 120 brotes de flor terminal en 9 árboles de una misma fila. La mitad de los brotes fueron polinizados manualmente con polen de mandarina 'Afourer', y la otra mitad con polen del tangor 'Ortanique'.

El día previo a las polinizaciones se colectaron flores de 'Afourer', del mismo cuadro, y de 'Ortanique', de un cuadro cercano. Las flores fueron colocadas en cajas de petri abiertas y depositadas en cámaras con silica gel durante 24 horas para provocar la apertura de las anteras. Luego las cajas, se mantuvieron en heladera durante 2 horas para que se hidrataran los granos de polen.

En el estado 59 de la escala BBCH (Agustí et al., 1997), se realizó la polinización manual de la mitad de los brotes con el polen de 'Afourer' y la otra

mitad con el polen de 'Ortanique' obtenido el día anterior, y se embolsaron igual que en el experimento 1.

A partir de las polinizaciones, se muestrearon cada 2 días 5 flores por tratamiento, a los: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 días post anthesis. Las flores fueron fijadas en una solución de FAA y se guardaron a 4 °C hasta su análisis.

3.4. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE FLORES

La calosa es un polisacárido de origen natural que se deposita, en forma de tapones en las paredes del tubo polínico durante su crecimiento, y en la zona de la chalaza cuando los óvulos comienzan a degenerarse. La misma, al teñirse con azul de anilina e iluminada con luz ultravioleta emite fluorescencia, lo que permite evaluar el crecimiento del tubo polínico y viabilidad de óvulos mediante el uso de microscopio de fluorescencia. Es un indicador fenotípico útil para determinar el sistema de incompatibilidad, crecimiento del polen y viabilidad de óvulos (Dumas y Knox, 1983).

Para la evaluación de la viabilidad de óvulos, las flores almacenadas fueron enjuagadas con agua destilada, y los ovarios se dejaron en una solución de sulfito sódico durante 12 horas aproximadamente.

Luego, en una nueva solución de sulfito sódico, los ovarios fueron ablandados en microondas durante 15-25 segundos. Bajo lupa binocular los ovarios ablandados fueron abiertos y con la ayuda de pinzas se rescataron los óvulos. Estos fueron colocados en portaobjetos y para teñirlos, se les agregó gotas de solución de azul de anilina al 0,1 % en K_2HPO_4 0, 1N (Kearns e Inouye, 1992). Luego de 20 minutos, se secaron con papel de filtro, se les agregó glicerina (para evitar su deshidratación), se cubrieron con cubreobjetos y se realizó un 'squash'.

Los preparados fueron observados bajo microscopio, Olympus Vanox AH3, y evaluados con el filtro U BH2-DMU (rango de línea de emisión Hg 334-365 nm).

La viabilidad se determinó contando la cantidad de óvulos viables del total rescatado del ovario analizado. Se consideró viable cuando no presentaba fluorescencia en la zona de la chalaza, indicando que no existía depósito de calosa en dicha zona.

Para el análisis microscópico de la viabilidad de óvulos y crecimiento del tubo polínico en el experimento 2, los pistilos de las flores almacenadas, se enjuagaron con agua destilada y se mantuvieron en sulfito sódico (5 %) por 12 horas aproximadamente. Luego las flores fueron cortadas separando el ovario del estilo-estigma y en una nueva solución de sulfito sódico se calentaron en microondas durante 15-25 segundos (dependiendo de la fecha de muestreo) para ablandar los tejidos.

Con el objetivo de evaluar la germinación de granos de polen y crecimiento del tubo polínico, los estilos y estigmas fueron cortados longitudinalmente con bisturí en dos o tres partes y teñidos con una solución de azul de anilina (0,1 %) en K_2HPO_4 0,1 N (Kearns e Inouye, 1992). Las secciones de estilo-estigma fueron colocadas en portaobjetos, secadas con papel filtro y cubiertas con una gota de glicerina para evitar su deshidratación. Luego se cubrieron con cubreobjetos y se realizó un 'squash'.

Los granos de polen fueron considerados germinados cuando el largo del tubo polínico superaba el diámetro del grano de polen. El porcentaje de germinación en el estigma se determinó contando en 3 campos el número de granos germinados del total de éstos. El crecimiento del tubo polínico en el estilo se determinó, como el porcentaje de longitud recorrido por el tubo polínico más largo.

3.5. GERMINACIÓN DE POLEN *in vitro*

En ambos experimentos, para evaluar la capacidad germinativa del polen utilizado (experimento 1: polen de 'Ortanique' y 'Lisbon'; experimento 2: polen de 'Ortanique' y 'Afourer'), se extrajeron muestras de polen y se cultivó en condiciones *in vitro*, en un medio de cultivo Brewbaker y Kwack (1969): 10 % de Sucrosa, 100 mg l^{-1} H_3BO_3 , 300 mg l^{-1} $Ca (NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 200 mg l^{-1} $MgSO_4 \cdot 7 \cdot H_2O$, 100 mg l^{-1} de KNO_3 . La mitad del medio se preparó líquido y a la otra mitad se le agregó 1 % de Phytigel para solidificarlo.

Para la siembra de los granos de polen, se trabajó en condiciones de asepsia; los portaobjetos, materiales y medios utilizados fueron previamente esterilizados en autoclave, y el proceso de siembra se realizó en cámara de flujo laminar.

La siembra de los granos se realizó de la siguiente manera: 1) se colocó en un portaobjetos 1,5 ml de medio sólido fundido; 2) con un pincel fino

se espolvoreó el polen sobre el medio sólido; 3) se cubrió el preparado con 30 μ l de medio líquido. Se realizaron 4-5 repeticiones por tratamiento.

Luego de la siembra, se colocaron en cámara a 25 °C y 70 % de humedad relativa, hasta que se visualizó la germinación de los granos de polen. Luego los preparados fueron fijados con una solución de FAA y almacenados a 4 °C hasta su análisis.

La germinación se evaluó en microscopio óptico, considerando germinado el grano cuando el largo del tubo polínico superaba su diámetro. Se contó el número de granos germinados y sin germinar, y de esta manera se calculó el porcentaje de germinación en cada repetición.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. GERMINACIÓN DE POLEN Y ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE FLORES

4.1.1. Germinación de polen *in vitro*

El porcentaje de germinación de polen *in vitro* de 'Afourer' fue en promedio de 39 %, el de limón tipo 'Lisbon' fue de 43 %, mientras que el de 'Ortanique' alcanzó el 54 % en el experimento 1 y 50 % en el experimento 2 (Cuadro 1). Estos resultados están dentro de los porcentajes alcanzados por Pardo et al. (2007), que utilizando la misma técnica y medio de cultivo, determinaron la capacidad germinativa del polen de 40 genotipos de citrus en dos años consecutivos, alcanzando valores entre 0,6 a 86,3 % de germinación. Estos autores encontraron diferencias entre especies y variedades, así como en los dos años consecutivos del estudio. Para 'Afourer' y 'Ortanique' obtuvieron un porcentaje de germinación de polen aproximado de 72 % y 67 % respectivamente (en promedio en los dos años). Resultados nacionales sobre germinación de polen *in vitro* de ambas variedades reportan un porcentaje de germinación de 25 % (Gravina et al., 2011), inferior a lo alcanzado en este experimento.

Cuadro 1. Porcentaje de germinación *in vitro* de polen de limón tipo 'Lisbon', tangor 'Ortanique' y mandarino 'Afourer', en los dos experimentos.

	Tratamiento	% germinación
Experimento 1	Limón tipo 'Lisbon'	43
	'Ortanique'	54
Experimento 2	'Afourer'	39
	'Ortanique'	50

El porcentaje de germinación *in vitro* alcanzado indica que el polen de los tres genotipos es viable y no presenta ningún impedimento para su germinación, en condiciones nutritivas y ambientales favorables.

En variedades que presentan esterilidad gamética masculina, como sucede en Satsuma 'Owari' y 'Okitsu' se han encontrado bajos porcentajes de germinación, 4,8 % en promedio (Pardo et al., 2007).

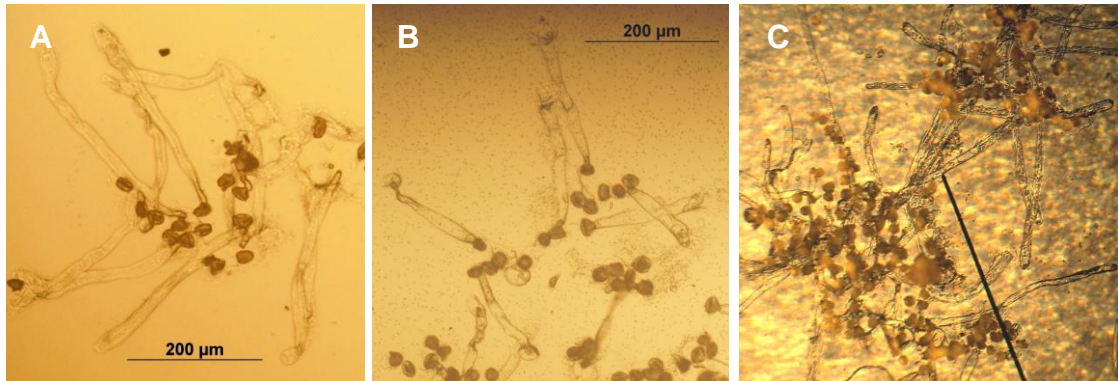


Figura 4. Fotografía de germinación *in vitro* de granos de polen de 'Afourer' (A), 'Ortanique' (B) y limón tipo 'Lisbon' (C).

4.1.2. Germinación de granos de polen en el estigma

La presencia de granos de polen en el estigma se constató hasta la tercera fecha de muestreo (4 días después de la polinización), y a partir de la cuarta fecha solamente se observaron tubos polínicos (Figura 5). Debido a la degeneración de la superficie estigmática, a partir del día 6 no se pudo calcular el porcentaje de germinación ya que no se visualizaban claramente los granos y aunque se veían tubos polínicos, no se podía contar el número de granos totales.

Cuadro 2. Porcentaje de germinación de granos de polen de mandarina 'Afourer' y tangor 'Ortanique' en el estigma de flores de 'Afourer'.

Día	% germinación en el estigma	
	'Afourer'	'Ortanique'
0	0	0
2	20	0
4	8,6	9,7

El máximo porcentaje de germinación observado en 'Afourer' fue de 20 % en el día 2, mientras que en la misma fecha, el polen de 'Ortanique' seguía sin germinar en el estigma de 'Afourer'. En el día 4, el porcentaje de germinación de 'Afourer' disminuyó a 8,6 % y en 'Ortanique' fue de 9,7 %, siendo el máximo alcanzado con el polen de esta variedad (Cuadro 2).

En los días 10 y 12, se perdieron las flores polinizadas con 'Ortanique', debido a deshidratación, por lo que únicamente se analizaron las flores polinizadas con 'Afourer'.

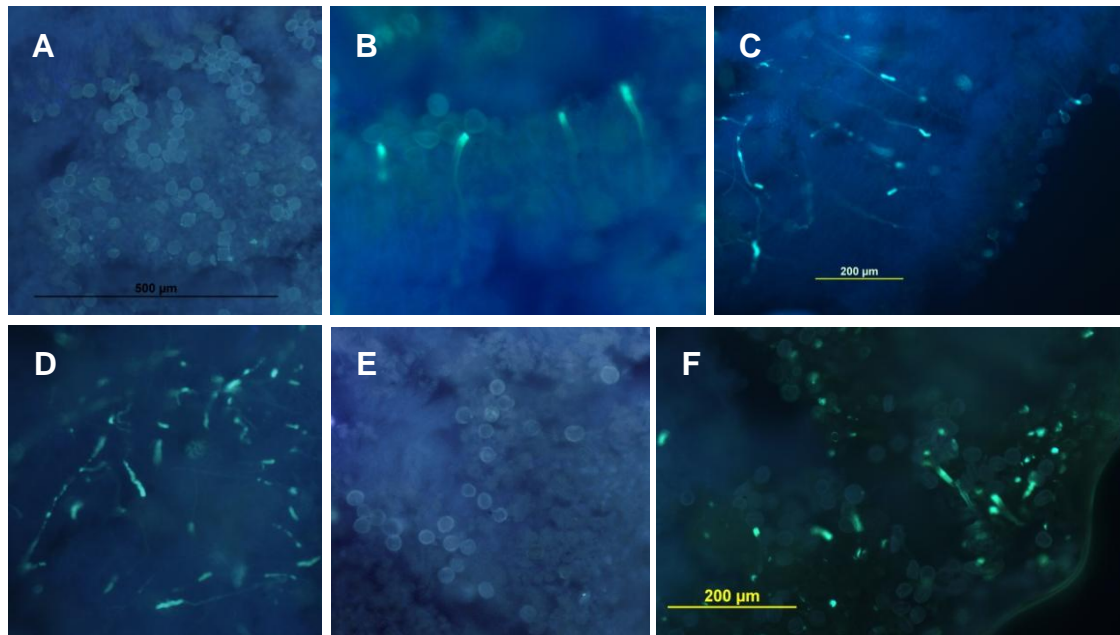


Figura 5. Estigma de flores de 'Afourer' con: granos de polen de 'Afourer' sin germinar en el día 0 (A), germinados y con crecimiento de tubo polínico en el día 4 (B y C) y tubos polínicos en el día 6 (D); granos de polen de 'Ortanique' en el día 0 (E) y tubos polínicos en el día 6 (F).

El mayor porcentaje de germinación alcanzado *in vitro* que en el estigma, puede deberse a las diferentes condiciones a las que estuvieron sometidos. Asumiendo que tanto el medio de cultivo como el estigma son superficies favorables para la germinación de los granos, las diferencias pueden deberse a las condiciones ambientales. El efecto de la temperatura sobre la germinación del polen ha sido estudiado por diferentes autores (Pardo et al. 2010, Hedhly 2011, Distefano et al. 2012). Los últimos autores encontraron una interacción significativa entre el genotipo y la temperatura. En la mayoría de los genotipos, el porcentaje de germinación se incrementaba con el aumento progresivo de la temperatura en un rango de 15° a 25 °C, concluyendo que, a una temperatura óptima, todos los genotipos tuvieron una viabilidad suficiente.

Los preparados *in vitro* se mantuvieron a temperatura y humedad controlada de 25 °C y 70 % HR, que promueven la germinación. Mientras que la temperatura media registrada en el campo en los días posteriores a la polinización, fue de 16 °C. Por lo que el comportamiento del polen no solo es una característica inherente del genotipo del polen sino que depende de la combinación polen-estigma y las interacciones genotipo x temperatura.

Estos resultados de germinación *in vivo* de polen de 'Afourer', demuestran que su polen es viable y capaz de germinar en el estigma de su misma variedad, y los tubos son capaces de crecer en él, atravesarlo y avanzar hacia el estilo (Figura 5). Aunque la germinación del polen de 'Ortanique' fue inferior al polen de 'Afourer', se observaron varios tubos polínicos en el estigma y también lograron avanzar hacia el estilo.

Distefano et al. (2009b) no encontraron diferencias claras en el estigma en cruzamientos compatibles e incompatibles entre 6 cultivares de citrus. Estos autores alcanzaron un 75 % de germinación de granos de polen de 'Fortune' en el estigma de 'Nova' (2 días después de polinizados) y más de 100 tubos polínicos alcanzaron la parte superior del estilo (Distefano et al., 2011). Mesejo et al. (2007b) también encontraron que los granos de polen de mandarina 'Fortune' germinaron en estigmas de 'Clementina de Nules', Satsuma 'Owari' y naranjo dulce 'Valencia', y alcanzaron los canales estilares 2 días después de polinizados en antesis.

4.1.3. Crecimiento del tubo polínico en el estilo

En el día cero no se observó crecimiento de tubos en el estilo. Recién comenzó a observarse a partir del día 2. En esa fecha, la mayoría de los tubos polínicos de 'Afourer' alcanzaban el final del estigma y recorrían un 10-15 % del estilo.

En el día 4, los tubos polínicos 'Afourer' recorrían el 20-25 % del estilo, mientras que los de 'Ortanique' alcanzaban el final del estigma y algunos pocos el 10 % del estilo. Esto puede explicarse por el mayor tiempo requerido por 'Ortanique' para germinar en el estigma de 'Afourer'. Los tubos polínicos de tangelo 'Orlando', alcanzaron la base del estigma o parte superior del estilo de sus propias flores y flores de mandarina 'Dancy' 3 días después de polinizadas. En esa fecha en el cruzamiento compatible entre 'Orlando' y 'Dancy' también se observaron tubos en la primera mitad del estilo (Kahn y DeMason, 1988).

En nuestro experimento, al día 6, el polen de 'Afourer' había recorrido un 30-40 % del estilo, y en el día 8 un 40 %, el máximo recorrido observado. Este resultado coincide con lo encontrado por Fornero et al. (2012), que registran en el día 6 un 40 % de recorrido por tubos polínicos de 'Afourer' en su propio estilo, siendo el máximo porcentaje alcanzado en dicho estudio. Luego de esa fecha, no se observó mayor crecimiento de los tubos de 'Afourer' en el estilo y, en las últimas fechas de muestreo, el estilo-estigma abscisionó.

Cuadro 3. Porcentaje de estilo recorrido por tubos polínicos de 'Afourer' y 'Ortanique' en las fechas de muestreo.

Día	% estilo recorrido	
	'Afourer'	'Ortanique'
0	0	0
2	15	0
4	25	10
6	35	100
8	40	100
10	40	Sd

Estos resultados indican que, aunque el polen de 'Afourer' es viable y capaz de germinar en el estigma de sus propias flores, su crecimiento a través del estilo se ve detenido en la mitad superior del mismo. Esto indicaría que se está frente a un sistema de incompatibilidad de tipo gametofítico, en donde el polen incompatible germina exitosamente en el estigma, lo penetra y crece hacia el estilo, pero en un momento determinado su crecimiento se detiene. A diferencia de lo que sucede en plantas que presentan autoincompatibilidad de tipo esporofítico, en donde el crecimiento se detiene en la superficie del estigma. Mientras que en el sistema esporofítico la incompatibilidad está determinada por el genotipo diploide de la planta donadora de polen, en el gametofítico esta dado por el propio genotipo haploide del polen (Newbigin et al., 1993). A su vez, la temperatura tiene un efecto sobre la reacción de autoincompatibilidad, afectando el lugar donde los tubos polínicos se detienen (Distefano et al., 2012).

Los resultados sobre autopolinizaciones en variedades de Clementina, que en su mayoría son autoincompatibles, demuestran que los tubos polínicos de esta variedad detienen su crecimiento en la parte superior o media del estilo de sus flores (Eti y Stosser 1992, Distefano et al. 2009a). En autopolinizaciones de la variedad de Clementina 'Monreal' (mutación autocompatible de Clementina 'Comune'), los tubos crecen a lo largo del estilo y alcanzan la base a los 6 días (Distefano et al., 2009a). A su vez, Eti y Stosser (1992) realizaron cruzamientos entre Clementina con tres variedades, y encontraron que los tubos polínicos de las otras variedades crecieron intercelularmente en la parte superior del estilo, alcanzando los óvulos por los canales estilares entre 5 y 12 días. También ha sido demostrado que el polen de 'Fortune' es capaz de recorrer el estilo y alcanzar los óvulos a los 10 días en 'Clementina de Nules' (Mesejo, 2007a).

Ngo et al. (2001) realizaron autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas entre siete cultivares de citrus autoincompatibles y tres autofértiles. Encontraron que, en la mayoría de las autopolinizaciones, los tubos polínicos se detuvieron en el estigma y estilo a los 6 días después de polinizados, mientras que, en la mayoría de las polinizaciones cruzadas, los tubos penetraron los ovarios a los 4-8 días.

Se han encontrado diferencias en las autopolinizaciones y cruzamientos entre 'Fortune' y 'Nova'. En las autopolinizaciones, 4 días después de polinizadas, los tubos polínicos se detuvieron en la primer mitad del estilo, mientras que en el cruzamiento, los tubos continuaron su crecimiento hasta la base del estilo (Distefano et al., 2009b). A su vez, los tubos polínicos de 'Fortune' penetraron el micrópilo y atravesaron la nucela en óvulos de 'Nova' a los 12 días post-polinización (Distefano et al., 2011). Similares resultados alcanzaron Kahn y DeMason (1988) en cruzamientos autoincompatibles de mandarina 'Orlando' y compatibles con mandarina 'Dancy'. En el día 6 post-polinización en el cruzamiento incompatible los tubos se detuvieron en la primera mitad del estilo y solo algunos pocos alcanzaron la parte inferior del mismo. Mientras que en el cruzamiento compatible los tubos alcanzaban la base y algunos los canales del ovario, penetrando el micrópilo entre el día 9 y 12 post-polinización.

La reacción de incompatibilidad se da entre el genotipo haploide del gametofito masculino contenido en el grano, y el tejido (diploide) del pistilo

(Newbiggin et al., 1993). Se han propuesto distintos momentos en los que se adquiere la reacción de incompatibilidad. Mientras algunos proponen que se adquiere tardíamente, justo antes de la antesis (Distefano et al., 2009b), otros reportan que comienza 6 días antes de la antesis y va incrementándose hasta dicho momento (Ngo et al., 2001).

A su vez, se han reportado diferencias en cuanto al comportamiento y morfología del polen dependiendo si el cruzamiento es compatible o incompatible. En el primer caso, los tubos crecen derechos sin girar y tienen paredes delgadas con depósitos de calosa de tamaño regular a intervalos regulares. Sin embargo, en los cruzamientos incompatibles, los tubos crecen con deposiciones irregulares de calosa en las paredes y grandes deposiciones en las puntas (Khan y DeMason 1988, Ngo et al. 2001, Distefano et al. 2009a, Distefano et al. 2009b).

4.1.4. Viabilidad de óvulos

La viabilidad de los óvulos se determinó como el porcentaje de óvulos sin presencia de depósito de calosa en la zona chalazal, en las distintas fechas de muestreo (Figura 6). Mientras que el 100 % de los óvulos de flores polinizadas con limón tipo 'Lisbon' permanecían viables en el día 7 del experimento 1, en las flores polinizadas por 'Ortanique' y en libre polinización ya comenzaban a verse óvulos inviables, siendo la viabilidad de 90 % y 85 % respectivamente. En el día 13 de muestreo, la viabilidad de óvulos en condiciones de libre polinización disminuyó drásticamente a 14 % y siguió disminuyendo hasta el día 17. En las flores polinizadas en forma manual la viabilidad disminuyó pero se mantuvo por encima del 50 % (Cuadro 4).

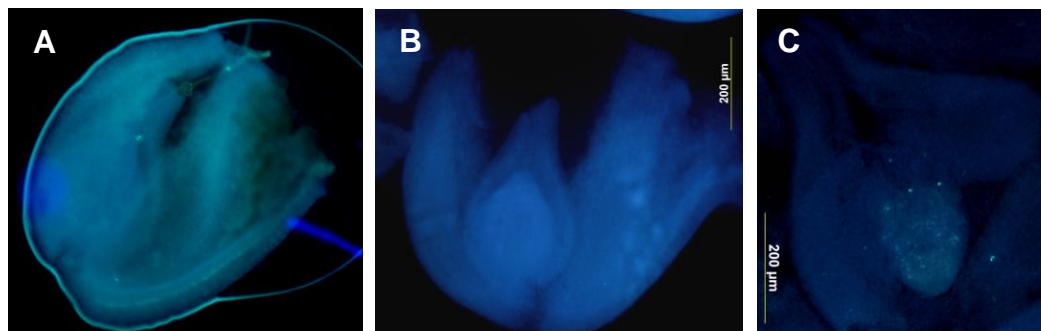


Figura 6. Óvulos de 'Afourer' en el día 13 polinizados con limón tipo 'Lisbon' (A), 'Ortanique' (B) y en libre polinización (C).

En el experimento 2, hasta el día 6 no se encontraron diferencias entre flores polinizadas por 'Afourer' y 'Ortanique', y la viabilidad de óvulos fue de 100 % en ambos casos (Cuadro 4). Es preciso señalar que, en flores muestreadas el día 2 y 4, comenzaron a observarse pequeños puntos fluorescentes dispersados en los óvulos, pero solo se consideró no viable cuando presentaban un tapón de calosa.

Cuadro 4. Porcentaje de viabilidad de óvulos de mandarina 'Afourer' en los experimentos 1 y 2 por fecha de muestreo.

Experimento 1		% viabilidad de óvulos		
Día	'Lisbon'	'Ortanique'	Libre polinización	
7	100	90	85	
13	67	75	14	
17	53	60	7	

Experimento 2		% viabilidad de óvulos	
Día	'Afourer'	'Ortanique'	
0	100	100	
2	100	100	
4	100	100	
6	100	99	
8	82	92	
10	91	Sd	
12	91	Sd	
14	44	40	

A partir del día 8 comenzaron a observarse óvulos con deposición de calosa. En la última fecha de muestreo, 14 días luego de la polinización, más de la mitad de los óvulos, tanto de flores polinizadas con 'Afourer' como con 'Ortanique' presentaban deposiciones de calosa en forma de tapón (Figura 7).

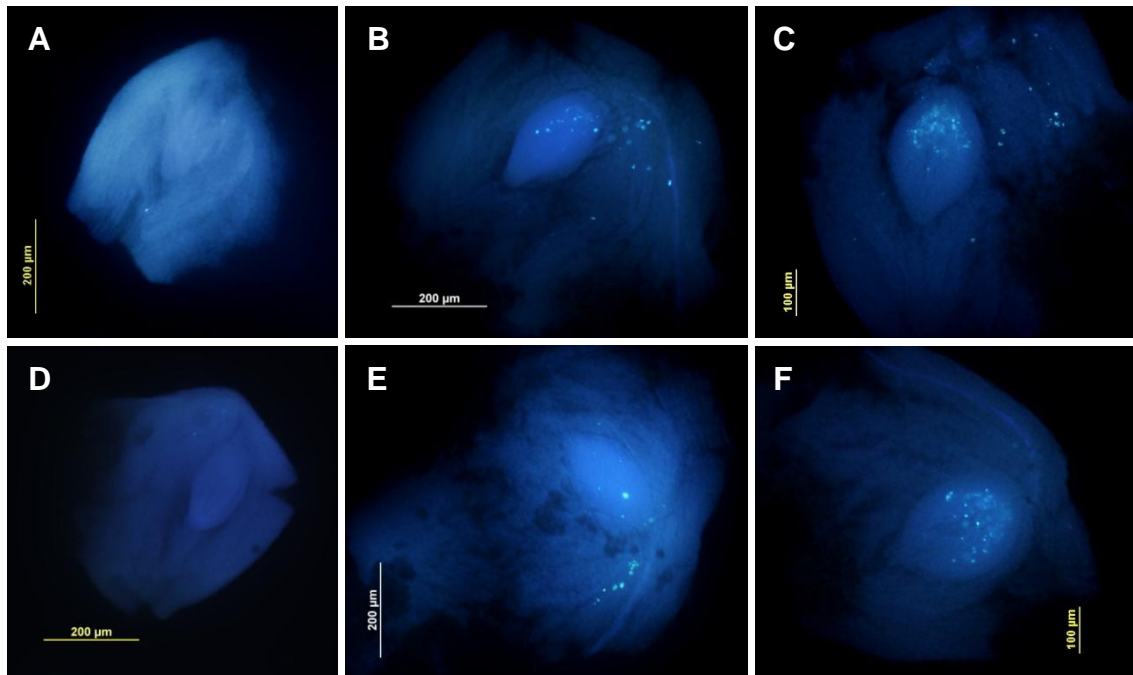


Figura 7. Óvulos en el día 0, día 8 y día 14 de: 'Afourer' (A, B y C, respectivamente) y 'Ortanique' (D, E y F, respectivamente).

Mesejo et al. (2007b) evaluaron la viabilidad de óvulos en flores no polinizadas de 'Clementina de Nules' y su efecto sobre el período de polinización efectiva. Observaron que en flores de 16, 18 y 20 días de edad el 60, 43 y 20 % de los óvulos continuaban viables y eran capaces de ser fecundados y formar semillas. Sin embargo, no se observaron semillas en flores polinizadas a partir de 10 días después de antesis, debido a que el estigma dejó de estar receptivo, siendo éste el principal parámetro determinando el período de polinización efectiva en 'Clementina de Nules'. A su vez, Mesejo et al. (2006) observaron un 36 % de óvulos con depósito de calosa en flores de 'Clementina de Nules' sin polinizar a los 12 días, mientras que en flores polinizadas con 'Fortune' era menos del 5 %. Tadeo y Primo-Millo (1988) observaron los primeros síntomas de degeneración anatómica 15 días después de antesis en óvulos sin fecundar de 'Navelate', que no contiene semillas.

Los resultados obtenidos en las flores polinizadas con 'Ortanique', en el experimento 2, no son los esperados, considerando que la formación del tapón de calosa es un indicador fenotípico asociado a la degeneración de los óvulos que se forma en ausencia de fecundación. Teniendo en cuenta que el polen de

‘Ortanique’ es compatible con ‘Afourer’, sus tubos polínicos alcanzaron la base del estilo y que el 98 % de los frutos en el experimento 1 (de flores polinizadas con ‘Ortanique’) presentaron semillas, lo esperable hubiera sido que la viabilidad de los mismos fuera mayor a la encontrada con polen de ‘Afourer’, ya que el polen de ‘Ortanique’ es capaz de fecundar los óvulos de esta variedad.

Esto último se pudo evidenciar en el experimento 1, donde la viabilidad de óvulos en flores polinizadas con ‘Ortanique’ disminuyó pero fue superior a los de libre polinización. Las diferencias encontradas en los dos años pueden deberse a las distintas condiciones de humedad relativa durante la floración, ya que la temperatura en dicho período no varió entre años. La humedad relativa fue mayor en la floración del año 2011 que en el 2010, en el año 2011 a su vez se registraron 17 mm de lluvia el día posterior a las polinizaciones manuales (Cuadro 5). Esto último pudo dificultar la fijación de los granos de polen, significando un menor número de granos en el estigma, menor número de tubos polínicos que llegaron a los óvulos y menor viabilidad de óvulos debido a la ausencia de fecundación (Cuadro 2, 4).

Cuadro 5. Humedad relativa y precipitaciones: previo a la antesis, antesis, y post-antesis, en los años 2010 y 2011.

Momentos	2010		2011	
	HR (%)	Precipitaciones (mm)	HR (%)	Precipitaciones (mm)
Días previos a antesis ^a	80	28	81	33
Antesis ^b	76	0	76	0
Días post-antesis ^c	69	0	70	17

a: 7 días previo a la fecha de polinización

b: fecha en que se realizaron las polinizaciones (19/10/2010 y 11/10/2011)

c: 5 días después de polinizar

A su vez, no solo es importante el tiempo que tardan los tubos polínicos en llegar a la base del estilo, sino también el tiempo que demoran en crecer por el ovario hasta llegar a los óvulos y fecundarlos. Distefano et al. (2011) encontraron que en el ovario de *Citrus*, ocurrían cambios en las papilas unidas a las células que rodeaban los canales estilares en la zona entre el estilo y el

ovario. Las papilas se elongaban y al mismo tiempo se hacían más finas que en antesis, y comenzaban una etapa secretora. Los tubos polínicos alcanzaban los óvulos a través de las papilas elongadas al mismo tiempo que éstas comenzaban la fase secretora.

4.2. POLINIZACIÓN CRUZADA Y PRESENCIA DE SEMILLAS

4.2.1. Evolución de la abscisión y porcentaje de cuajado final

Los resultados obtenidos plantean una respuesta diferente entre tratamientos. Las flores polinizadas manualmente con polen de 'Ortanique' y limón tipo 'Lisbon' alcanzaron un mayor porcentaje de cuajado en relación a las que quedaron en libre polinización (Cuadro 6). El cuajado en general fue alto, siendo este último el tratamiento que cuajó menos, 30 %. Este resultado fue menor a lo encontrado por Gravina et al. (2011) donde 'Afourer' presentó alta habilidad partenocárpica en las condiciones de Paysandú y San José, alcanzando 70 % de cuajado en condición de libre polinización, y más de 40 % en flores emasculadas y en flores embolsadas.

El alto porcentaje de cuajado en estos experimentos, también puede deberse a que las flores seleccionadas fueron de brotes de flor terminal, los que presentan una mayor capacidad de retención en relación a flores solitarias o ubicadas en inflorescencias. Los brotes con hojas en general presentan mayor cuajado debido a la cercanía a la fuente de fotoasimilados, requeridos en la fase de división celular. A su vez aparecen más tarde en la brotación, escapando de la competencia inicial entre flores (Lovatt et al., 1984). La menor abscisión de este tipo de brotes también puede deberse a que éstos presentan un área vascular significativamente mayor que los brotes sin hojas, lo que se asocia a una mayor capacidad de transporte de agua y nutrientes (Erner, 1989).

En la evolución del cuajado se observa que hasta los 50 días post-antesis todos los tratamientos presentaban la misma cantidad de frutos, a partir de esa fecha se produce una caída importante y los tratamientos comienzan a diferenciarse estadísticamente (Figura 8).

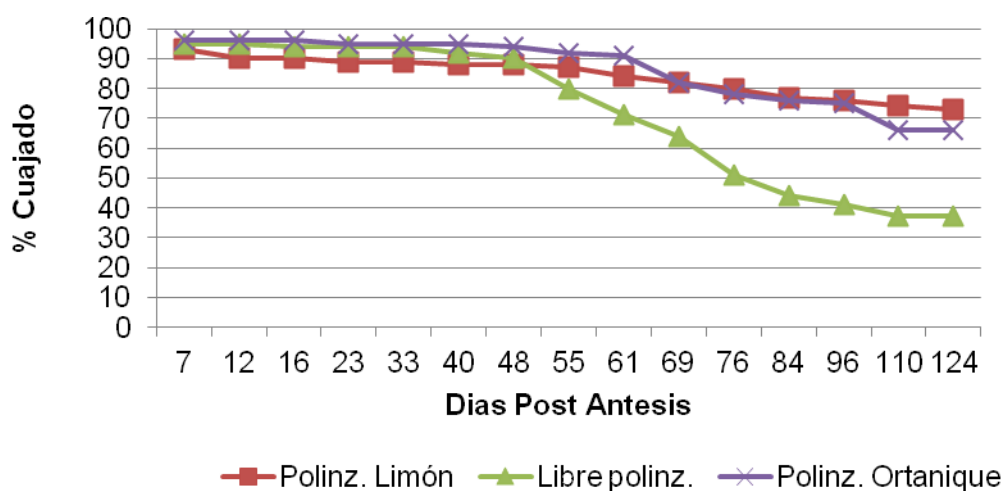


Figura 8. Evolución del cuajado de frutos provenientes de flores en condiciones de libre polinización, polinizadas con limón tipo ‘Lisbon’ y ‘Ortanique’.

La abscisión producida en este periodo, en donde aún los frutos están en fase I de crecimiento, se debe principalmente a una fuerte competencia por asimilados, que deja a los frutos en libre polinización en desventaja frente a los polinizados manualmente.

La menor capacidad competidora de estos frutos y por consiguiente un menor cuajado final, se explica por una baja presencia de semillas constatada en la cosecha. Esta variable, medida como porcentaje de frutos con semilla de los frutos cosechados, fue menor en aquellos que quedaron en libre polinización, relacionándose con un menor cuajado final (Cuadro 6).

Cuadro 6. Porcentaje de cuajado final y porcentaje de frutos con semillas, por tipo de polinización.

Tratamiento	% Cuajado Final	% Frutos con semillas.
Polinización con limón tipo ‘Lisbon’	71 a ^z	100 a
Polinización con ‘Ortanique’	61 a	98 a
Libre polinización	30 b	33 b

^z Medias seguidas por distinta letra dentro de cada columna difieren estadísticamente ($p \leq 0,05$)

El limón tipo 'Lisbon' y el tangor 'Ortanique', resultaron ser excelentes polinizadores cuando su polen fue depositado en una cantidad importante, ejerciendo una alta presión sobre los estigmas de 'Afourer', no así en condiciones de libre polinización.

La polinización natural se ve afectada por las características ambientales, sobre todo por la temperatura y la humedad relativa. El efecto de la temperatura puede ser indirecto, al alterar la actividad de las abejas, o directamente, afectando el crecimiento del tubo polínico, la receptividad del estigma, germinación del grano de polen y la longevidad del óvulo.

La proximidad entre variedades intercompatibles resulta un factor esencial para que se produzca la polinización cruzada.

La baja presencia de semillas en frutos que quedaron en libre polinización indica que la llegada de polen al cuadro del experimento es escasa. Lo que podría explicarse por cercanía a variedades estériles ('W. Navel') y autoincompatibles ('Afourer'), baja sincronización de la floración con variedades compatibles (limón tipo 'Lisbon') y una distancia mínima de 400 metros con variedades compatibles ('Ortanique').

La diferencia de cuajado entre tratamientos podría estar explicada por variaciones en el contenido hormonal en los ovarios en desarrollo. Las giberelinas y citoquininas son consideradas reguladores de crecimiento favorables al desarrollo del fruto. En particular las giberelinas, han sido reportadas como promotoras del cuajado, tanto en variedades con semillas, siendo éstas el principal sitio de síntesis, como en las variedades de alto índice partenocárpico en las cuales son las paredes del ovario las que cumplen esta función.

La capacidad de fosa de los frutos con semillas es mayor a la de los frutos partenocárpico, explicado principalmente por un mayor contenido endógeno de giberelinas (Talón et al., 1992). En variedades autoincompatibles en condiciones de aislamiento, se logra producir frutos sin semillas, muchas veces con baja productividad (Jackson y Futch, citados por Chouza, 2010).

Estos resultados sugieren que en condiciones de libre polinización, el polen que llegó a la parcela transportado por abejas no fue suficiente para fecundar un número importante de flores, por lo que muchos frutos se desarrollaron en forma partenocárpica, quedando con menor capacidad

competidora frente a los que se les forzó la llegada de polen. Esto estaría explicando las diferencias en cuajado entre las flores polinizadas artificialmente y las que quedaron en libre polinización.

4.2.2. Presencia y número de semillas

'Afourer' presentó en este experimento buena afinidad con los dos polinizadores utilizados; para la polinización con limón tipo 'Lisbon' el número promedio de semillas por fruto fue de 6, y para los provenientes de polinizaciones con 'Ortanique' fue 4. Este resultado difiere notoriamente de lo encontrado por Gravina et al. (2011), en donde estas mismas variedades no fueron eficientes polinizadoras en 'Afourer' en las condiciones de San José. Sin embargo Bono et al. (2000) evaluaron la afinidad de 'Fortune', 'Nova' y 'Ortanique', encontrando un alto número de semillas por fruto, en promedio 9, 10 y 7, respectivamente. Esto demuestra una alta variabilidad de los resultados sobre polinización cruzada en esta variedad.

Cuadro 7. Número promedio de semillas por fruto provenientes de flores de 'Afourer' polinizadas con 'Ortanique' y limón tipo 'Lisbon'.

Tratamiento	No. semillas/fruto (en frutos con semilla)		No. semillas en el total de frutos
	Promedio	Rango	
Polinización con limón tipo 'Lisbon'	6,0 a ^z	1-15	6,0 a
Polinización con 'Ortanique'	4,4 ab	1-17	4,4 ab
Libre polinización	1,5 b	1-3	0,5 b

^z Medias seguidas por distinta letra dentro de cada columna difieren estadísticamente ($p \leq 0,10$)

El 100 % de los frutos provenientes de polinización con limón presentó semillas en un rango de 1-15 por fruto, esto concuerda con el alto porcentaje de germinación del polen *in vitro* que fue de 43 %. El polen de 'Ortanique' también tuvo una alta germinación *in vitro* registrándose un porcentaje de 54 % y el número máximo de semillas encontradas fue de 17.

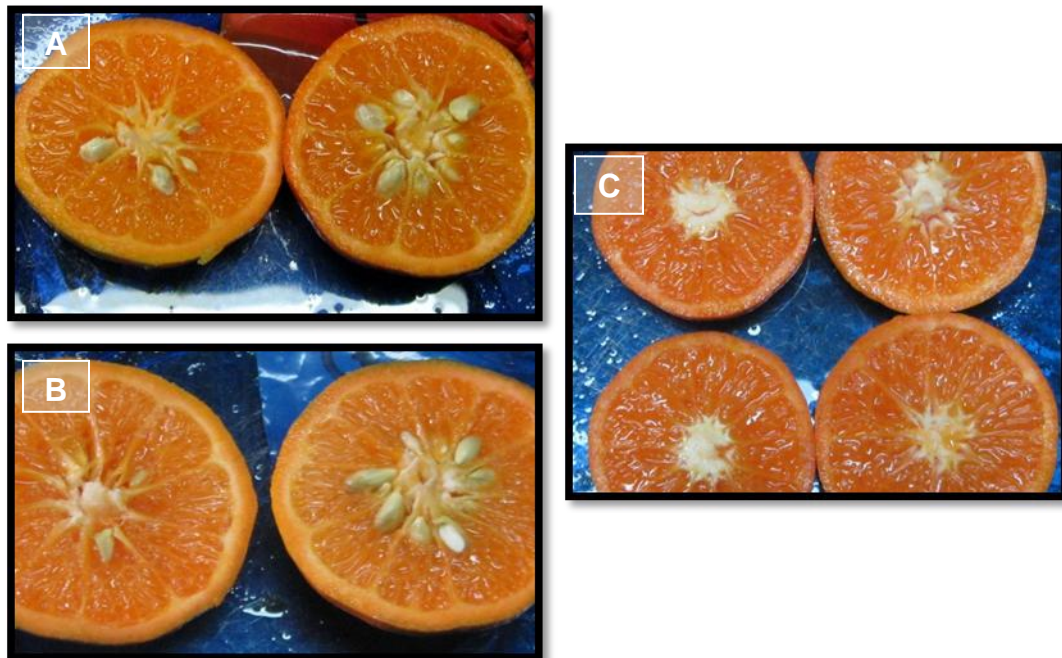


Figura 9. Cortes transversales de frutos cosechados por tratamiento: frutos polinizados con limón tipo 'Lisbon' (A), frutos polinizados con polen de 'Ortanique' (B) y frutos en libre polinización (C).

Es así que Chao (2005a), plantea en su trabajo que para producir mandarinas sin semilla, los productores deberían plantar en grandes bloques de la misma variedad, o tratar de usar naranjas del grupo navel o mandarina Satsuma como filtro para evitar la polinización cruzada. De esta manera se evitaría la polinización cruzada, ya que la distancia máxima que las abejas pudieron trasladar polen fue de 960 metros.

Debido a la proximidad entre 'Afourer' y variedades intercompatibles que se da en nuestras condiciones, es necesario recurrir a otras estrategias para evitar la polinización cruzada, como el uso de mallas antiabejas o repelentes. En plantaciones a futuro se debería poner énfasis en aislar las plantas de 'Afourer' de variedades capaces de polinizarla.

4.2.3. Tamaño de frutos

La evolución del diámetro ecuatorial de los frutos, presenta el comportamiento lineal característico de la fase II. La tasa de crecimiento es similar entre los tratamientos hasta el fin de la caída fisiológica; a partir de esa

fecha los frutos provenientes de libre polinización disminuyen significativamente su crecimiento en relación a los polinizados.

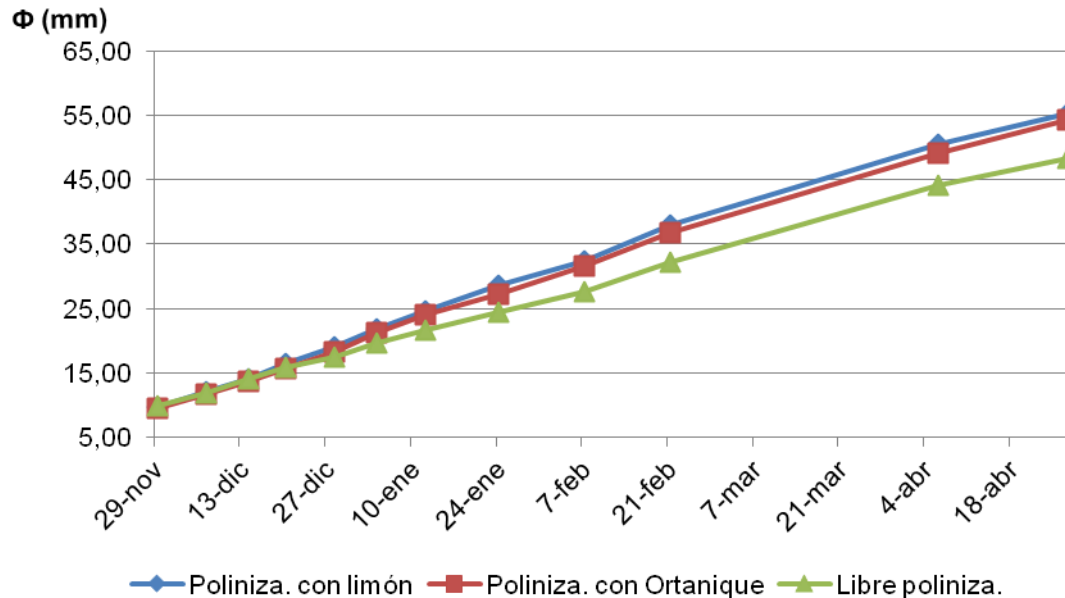


Figura 10. Evolución del diámetro ecuatorial de frutos de mandarina ‘Afourer’, por tratamiento de polinización.

La diferencia en el diámetro ecuatorial de los frutos polinizados, respecto a los de libre polinización, está explicada principalmente por la presencia de semillas. Agustí et al. (2005), indican que en ‘Afourer’ la presencia de semillas condiciona el tamaño de sus frutos, correlacionando positivamente estas variables.

En las condiciones de nuestro experimento, se pone de manifiesto la importancia de las semillas en el desarrollo y crecimiento del fruto, como sitio de síntesis de hormonas. Los frutos provenientes de flores polinizadas manualmente fueron 6 mm superiores en tamaño a los provenientes de libre polinización, alcanzando diferencias significativamente con los frutos de flores polinizadas con limón (Cuadro 8).

Cuadro 8. Diámetro ecuatorial de frutos al momento de la cosecha en los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Diámetro final de fruto (mm)
Polinización con limón tipo 'Lisbon'	55,3 a ^z
Polinización con 'Ortanique'	54,3 ab
Libre polinización	48,3 b

^z Medias seguidas por distinta letra dentro de cada columna difieren estadísticamente ($p \leq 0,10$)

Este resultado concuerda con lo encontrado por Fornero et al. (2012), en donde los frutos provenientes de flores polinizadas con polen de naranjo 'Valencia' presentaron semillas en un 88 % y mejoraron su tamaño respecto a los frutos partenocárpicos.

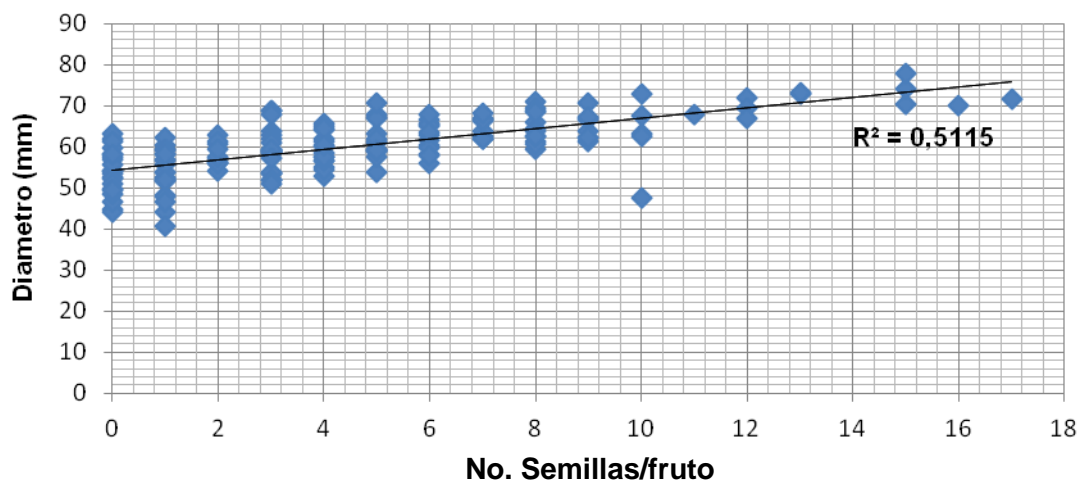


Figura 11. Correlación entre No. de semillas por fruto y diámetro de fruto, en mandarina 'Afourer'.

En este mismo cultivar, Pardo et al. (2010) encontraron una muy baja correlación entre el número de semillas y el diámetro final de fruto, con un $r=0,44$. Sin embargo, al estudiar la correlación analizando diferentes categorías de tamaño, encontraron una mayor proporción de frutos con 0 a 1 semilla en frutos con diámetros menores a 60 mm. En frutos entre 60-70 mm y mayores a 70 mm, la mayoría presentaba más de 3 semillas.

En este experimento la correlación entre el número de semillas y diámetro de fruto fue de 0,51, indicando que sólo una parte del tamaño final del

fruto está explicado por el número de semillas, existiendo otro tipo de factores que lo condicionan.

5. CONCLUSIONES

- En las autopolinizaciones de la variedad 'Afourer' los tubos polínicos detuvieron su crecimiento en la primera mitad del estilo, 8 días post antesis, confirmando que la reacción de autoincompatibilidad que se da en esta variedad es de tipo gametofítico.
- Los óvulos de flores de 'Afourer' polinizadas por 'Afourer' y 'Ortanique' comenzaron el proceso de degeneración entre 6 y 8 días post antesis.
- Tanto el polen de limón tipo 'Lisbon' como el de 'Ortanique', resultaron eficientes polinizadores en 'Afourer' y fueron capaces de crecer a través de su estilo y llegar hasta sus óvulos a los 6 días post antesis.
- La menor presencia de semillas en frutos de libre polinización determinó un menor cuajado final de frutos.
- Los frutos provenientes de polinizaciones dirigidas presentaron mayor tamaño que los de polinización abierta, lo que puede explicarse por el mayor número de semillas por fruto.

6. RESUMEN

La mandarina 'Afourer' es un cultivar de reciente introducción en Uruguay y de alta demanda por los mercados. Es un cultivar patentado, registrado como autoincompatible, que en ausencia de polinización cruzada produce frutos sin semillas. En nuestras condiciones, su calidad se ve disminuida por una constante presencia de semillas en los frutos, lo que disminuye su valor comercial. Existe poco conocimiento sobre la biología reproductiva e intercompatibilidad con otros cultivares de *Citrus*. Debido a esta problemática, se plantearon como objetivos: 1) evaluar en mandarina 'Afourer' el período de viabilidad de los óvulos y crecimiento del tubo polínico en condiciones de autopolinización y polinización manual con 'Ortanique'; y 2) la presencia de semillas, cuajado y tamaño de frutos en condiciones de polinización abierta y dirigida con polen de 'Ortanique' y limón tipo 'Lisbon'. Los óvulos de flores de 'Afourer' polinizadas con su propio polen y polen de 'Ortanique' comenzaron el proceso de degeneración entre los días 6 y 8 post-antesis. Los tubos polínicos de 'Afourer' detuvieron su crecimiento en la primera mitad del estilo 8 días post-antesis, confirmando que la reacción de autoincompatibilidad es de tipo gametofítico. Tanto el polen de limón tipo 'Lisbon' como el de 'Ortanique', resultaron eficientes polinizadores en 'Afourer' y fueron capaces de crecer a través de su estilo y llegar hasta sus óvulos a los 6 días post-antesis. La menor presencia de semillas en frutos provenientes de libre polinización determinó un menor cuajado final de frutos, en relación a los frutos provenientes de polinizaciones dirigidas. A su vez estos frutos presentaron mayor tamaño que los de polinización abierta, lo que puede explicarse por el mayor número de semillas que presentaron.

Palabras clave: 'Afourer'; Polinización; Autoincompatibilidad; Semillas

7. SUMMARY

'Afourer' mandarin is a cultivar of recent introduction in Uruguay and highly demanded in markets. It is a patented cultivar, registered as self-incompatible that produces seedless fruit if cross-pollination is avoided. In our conditions, fruit quality is reduced because of a constant presence of seeds in fruits, which also reduces its commercial value. Very little is known about the reproductive biology and intercompatibility with other varieties of *Citrus*. Due to this problem the purpose of this research was to: 1) study ovule viability and pollen tube growth in self-pollination and hand-pollination with 'Ortanique'; and 2) evaluate the presence of seeds, fruit set and fruit size in open-pollination conditions and cross-pollination with 'Ortanique' and 'Lisbon' lemon in 'Afourer' mandarin. The degeneration of ovules from self-pollinated 'Afourer' flowers and pollinated with 'Ortanique' started between 6-8 days after anthesis. 'Afourer' pollen tubes growth was arrested in the upper part of the style 8 days after anthesis, proving that the autoincompatibility reaction in this cultivar is gametophytic. Pollen from 'Lisbon' and 'Ortanique' proved to be efficient pollinators of 'Afourer', and were able to grow within the style and reached the ovary 6 days after anthesis. Fewer number of seeds in fruits from open-pollination conditions resulted in a fewer fruit set in relation to fruits from hand-pollination conditions. Moreover, these fruits had bigger size than in the open-pollination treatment, which can be explained by the higher number of seeds in these fruits.

Keywords: 'Afourer'; Pollination; Self-incompatibility; Seeds

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abrol, D. 2012. Pollination biology, biodiversity conservation and agricultural production. Dordrecht, Springer. 792 p.
2. Agustí, M.; Almela, V.; Pons, J. 1992. Effects of girdling on alternate bearing in citrus. *Journal of Horticultural Science*. 67: 203-210.
3. _____.; Zaragoza, S.; Bleiholder, H.; Buhr, L.; Hack, H.; Klose, R.; STAUB, R. 1997. Adaptación de l'èchelle BBCH à la description des stades phénologiques des agrumes du genre *Citrus*. *Fruits*. 52: 287-295.
4. _____. 2003a. Citricultura. 2ª. ed. rev., ampl. Madrid, Mundi-Prensa. 422 p.
5. _____.; Martínez-Fuentes, A.; Mesejo, C.; Juan, M.; Almela, V. 2003b. Cuajado y desarrollo de frutos Cítricos. Valencia, Generalitat Valenciana, Conselleria D'Agricultura, Peixca I Alimentació. 80 p. (Sèrie Divulgació Tècnica no. 55)
6. _____.; Martínez-Fuentes, A.; Reig, C.; Mesejo, C. 2005. Comportamiento agronómico del tangor 'Afourer'. *Levante Agrícola*. 375: 124-128.
7. _____. 2010. Fruticultura. Madrid, Mundi-Prensa. 507 p.
8. Barry, G. H. 2004. The quest for seedless citrus fruit. In: International Citrus Congress (10th., 2004, Agadir, Marruecos). Proceedings. Agadir, Marruecos, International Society of Citriculture. v.1, p. 346
9. Bono, R; Soler, J.; Buj, A. 2000. Parámetros de calidad de los cítricos; el problema de las semillas. *Revista Comunidad Valenciana Agraria*. 16: 7-15.
10. Brewbaker, J. L.; Kwack, B. H. 1963. The essential role of calcium ion in the pollen tube growth. *American Journal of Botany*. 50 (9): 859-865.

11. Chao, C-C. T.; Fang, J.; Devanand, P. S. 2005a. Long distance pollen flow in mandarin orchards determined by AFLP markers-implications for seedless mandarin production. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 130 (3): 374-380.
12. _____. 2005b. Pollination study of mandarins and the effect on seediness and fruit size; implications for seedless mandarin production. *HortScience*. 40 (2): 362- 365.
13. Chouza, X. 2010. Alternativas para la inducción de partenocarpia en mandarina 'Montenegrina'. Tesis Maestría en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 89 p.
14. Distefano, G.; Caruso, M.; La Malfa, S.; Gentile, A.; Tribulato, E. 2009a. Histological and molecular analysis of pollen-pistil interaction in clementine. *Plant Cell Report*. 28: 1439-1451.
15. _____.; Las Casas, G.; La Malfa, S.; Gentile, A.; Tribulato, E. 2009b. Pollen tube behavior in different mandarin hybrids. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 134 (6): 583-588.
16. _____.; Gentile, A.; Herrero, M. 2011. Pollen-pistil interactions and early fruiting in parthenocarpic citrus. *Annals of Botany*. 108: 499-509.
17. _____.; Hedhly, A.; Las Casas, G.; La Malfa, S.; Herrero, M.; Gentile, A. 2012. Male-female interaction and temperatura variation affect pollen performance in *Citrus*. *Scientia Horticulturae*. 140: 1-7.
18. DaCunha Barros, M.; Gravina, A. 2006. Influencia del tipo de brote en el cuajado y tamaño final de fruto en tangor 'Ortanique'. *Agrociencia (Montevideo)*. 10 (1): 37-46.
19. Dumas, C.; Knox, R.B. 1983. Callose and determination of pistil viability and incompatibility. *Theoretical and Applied Genetics*. 67: 1-10.
20. El-Otmani, M.; Coggins, C. W. Jr.; Agustí, M.; Lovatt, C. L. 2000. Plant growth regulators in citriculture; world current uses. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 19: 395-447.

21. Erner, Y. 1989. Citrus fruit set; carbohydrate, hormone and leaf mineral relationship. *In*: Wright, C. ed. Manipulation of fruiting. London, Butterworths. pp. 233-242.
22. Eti, S.; Stosser, R. 1992. Pollen tube growth and development of ovules in relation to fruit set in mandarines cv. 'Clementine' (*Citrus reticulata* Blanco). *Acta Horticulturae*. no. 321: 621-625.
23. FAO. FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division of the FAO, IT). 2011. FAOSTAT database. (en línea). Rome. s.p. Consultado 07 jun. 2013. Disponible en <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>
24. Fasiolo, C.; Inzaurrealde, C.; Cakic, V.; Gravina, A. 2010. Cuajado de frutos en tangor 'Ortanique': su relación con factores exógenos. *In*: Simposio de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus (3°, 2010, Salto, Uruguay). Trabajos presentados. Montevideo, Facultad de Agronomía. pp. 68-71.
25. Fornero, C.; Galiger, S.; Inzaurrealde, C. 2012. Estudio del comportamiento reproductivo de la mandarina 'Afourer' (*Citrus reticulata* Blanco). Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 54 p.
26. Frost, H. B.; Soost, R. S. 1968. Seed reproduction: development of gametes and embryos. *In*: Reuther, W.; Batchelor, L. D.; Webber, H. J. eds. The citrus industry. Berkeley, University of California. v. 2, cap. 4. pp. 290 - 319.
27. Gambetta, G.; Borges, A.; Espino, M.; DaCunha Barros, M.; Rivas, F.; Arbiza, H.; Gravina, A. 2008. Mejora de la productividad de la mandarina 'Nova': aspectos fisiológicos y medidas de manejo. *Agrociencia* (Montevideo). 2 (2): 1-9.
28. Gómez-Cadenas, A.; Tadeo, F. R.; Talón, M.; Primo-Millo, E. 1996. Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of Cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiology*. 112: 401-408.
29. Gravina, A.; Arbiza, H.; Balbi, V. 1994. Efecto de aplicaciones de ácido giberélico y anillado sobre la producción de tangor 'Ellendale' (C.

sinensis L. Osb x *C. reticulata* Bl.) en Uruguay. Fruticultura Profesional. no. 61: 17-22.

30. _____. 1999. Ciclo fenológico-reproductivo en citrus, bases fisiológicas y manejo. Montevideo, Facultad de Agronomía. CSIC. 55 p.
31. _____.; Fornero, C.; Galiger, S.; Inzaurrealde, C.; Fasiolo, C.; Gambetta, G. 2011. Partenocarpia, polinización cruzada y presencia de semillas en mandarina 'Afourer'. *Agrociencia* (Montevideo). 15 (2): 40-47.
32. Hedhly, A. 2011. Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. *Environmental and Experimental Botany*. 74: 9-16.
33. Iwamasa, M. 1966. Studies on the sterility in genus citrus with special reference to the seedlessness. *Bulletin of the Horticultural Research Station B*. (6): 1-81.
34. Kearns, C. A.; Inouye, D. W. 1993. *Techniques for pollination biologists*. Colorado, University of Colorado. 538 p.
35. Khan, I. 2007. *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. Wallingford, CABI. 370 p.
36. Khan, T. L.; DeMason, D. A. 1988. *Citrus* pollen tube development in cross-compatible gynoecea, self-incompatible gynoecea, and *in vitro*. *Canadian Journal of Botany*. 66: 2527-2532.
37. Koltunow, A. M.; Soltys, K.; Nito, N.; McClure, S. 1995. Anther, ovule, seed, and nucelar embryo development in *Citrus sinensis* cv. Valencia. *Canadian Journal of Botany*. 73: 1567-1582.
38. Lord, E. M.; Eckard, K. J. 1985. Shoot development in *Citrus sinensis* L. (Washington Navel orange). I. Floral and inflorescence ontogeny. *Botanical Gazette*. 146: 320-326.
39. Lovatt, C. J.; Streeter, S. M.; Minter, T. C.; O'Connell, D. L.; Flaherty, D. L.; Freeman, M. W.; Goodell, P. B. 1987. Phenology of flowering of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Washington navel orange. In: International Citrus Congress (5th., 1984, San Pablo, Brasil).

Proceedings. s.l., International Society of Citriculture. v.1, pp.186-190

40. McClure, B. A.; Gray, J. E.; Anderson, M. A.; Clarke, A. E. 1990. Self-incompatibility in *Nicotiana alata* involves degradation of pollen Rrna. *Nature*. 347: 757-760.
41. Mesejo, C.; Martínez-Fuentes, A.; Reig, C.; Rivas, F.; Agustí, M. 2006. The inhibitory effect of CuSO₄ on *Citrus* pollen germination and pollen tube growth and its application for the production of seedlees fruit. *Plant Science*. 170: 37-43.
42. _____. 2007a. El control de la polinización cruzada en los cítricos. Tesis Doctoral. Valencia, España. Universitat Politècnica de València. 120 p.
43. _____.; Martínez-Fuentes, A.; Reig, C.; Agustí, M. 2007b. The effective pollination period in 'Clemenules' mandarin, 'Owari' Satsuma mandarin and 'Valencia' sweet orange. *Plant Science*. 173: 223-230.
44. _____.; Yuste, R.; Martínez-Fuentes, A.; Reig, C.; Iglesias, D. J.; Primo-Millo, E.; Agustí, M. 2013. Self-pollination and parthenocarpic ability in developing ovaries of self-incompatible Clementine mandarins (*Citrus Clementina*). *Physiologia Plantarum*. 148: 87-96.
45. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2011. Encuesta cítrica "Primavera 2010". Montevideo. 25 p.
46. _____. 2013. Encuesta cítrica "Primavera 2012". Montevideo. 24 p.
47. Muñoz-Fambuena, N.; Mesejo, C.; González-Mas, M. C.; Primo-Millo, E.; Agustí, M.; Iglesias, D. J. 2011. Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate-bearing 'Moncada' mandarin. *Annals of Botany*. 108: 511-519.
48. _____.; _____.; _____.; Iglesias, D. J.; Primo-Millo, E.; Agustí, M. 2012. Gibberellic acid reduces flowering intensity in sweet

orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] by repressing *CiFT* gene expression. *Journal of Plant Growth Regulation*. 31: 529-536.

49. Nadori, E. B. 2004. Nadorcott mandarin; a promising new variety. In: International Citrus Congress (10th., 2004, Agadir, Marruecos). Proceedings. Agadir, Marruecos, International Society of Citriculture. v.1, pp. 356-359.
50. Nasrallah, J. B.; Stein, J. C.; Kandasamy, M. K.; Nasrallah, M. E. 1998. Signaling the arrest of pollen tube development in self-incompatible plants. *Science*. 266 (5190): 1505-1508.
51. Newbigin, E.; Anderson, M. A.; Clarke, A. E. 1993. Gametophytic self-incompatibility systems. *The Plant Cell*. 5: 1315-1324.
52. Ngo, B. X.; Wakana, A.; Park, S. M.; Nada, Y.; Fukudome, I. 2001. Pollen tube behaviors in self-incompatible and self-compatible Citrus cultivars. *Journal of the Faculty of Agriculture (Kyushu University)*. 45 (2): 443-457.
53. Pardo, J.; Bermejo, A.; Cano, A.; Zaragoza, S. 2007. La germinación de polen y la formación de las semillas en los cítricos. *Levante Agrícola*. 384 (1): 16-20.
54. _____; Cano, A.; Bermejo, A.; Zaragoza, S. 2010. La temperatura, la viabilidad del polen y la formación de semillas en los cítricos. *Levante Agrícola*. 399 (1): 20-29.
55. Pardo, E.; Borges, A.; Gravina, A. 2010. Relación entre tamaño de fruto y número de semillas en mandarina 'Afourer'. In: Simposio de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus (3^o., 2010, Salto, Uruguay). Trabajos presentados. Montevideo, Facultad de Agronomía. pp. 68-71.
56. Pérez-Botella, J.; Tadeo, F. R.; Primo-Millo, E.; Talón, M. 1997. Influencia de la polinización en el crecimiento y abscisión del fruto de los cítricos. Relación entre giberelinas y partenocarpia en el híbrido 'Fortune'. In: Reunión Nacional de la SEFV (12^a.), Congreso

Hispano-Luso de Fisiología Vegetal (5^o., 1997, Córdoba). Trabajos presentados. Sevilla, Junta de Andalucía. 456 p.

57. Poehlman, J. M.; Sleper, D. A. 2003. Mejoramiento genético de las cosechas. 2^a. ed. México, Limusa. 511 p.
58. Saunt, J. 2000. Citrus varieties of the world, an illustrated guide. 2nd. ed. Norwich, Sinclair. 156 p.
59. Sozzi, G. O. 2007. Árboles frutales, ecofisiología, cultivo y aprovechamiento. Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía. 848 p.
60. Spiegel-Roy, P.; Goldshmidt, E. 1996. Biology of citrus. Cambridge, Cambridge University Press. 230 p.
61. Syvertsen, J. P.; Goñi, C.; Otero, A. 2003. Fruit load and canopy shading affect leaf characteristics and net gas exchange of 'Spring' navel orange trees. *Tree Physiology*. 23: 899-906.
62. Tadeo, F. R.; Primo-Millo, E. 1988. An ultrastructural study on development and degeneration of unfertilized citrus ovules. In: International Citrus Congress (6th., 1988, Tel Aviv, Israel). Proceedings. s.l., International Society of Citriculture. v.1, pp. 431-441.
63. _____.; Moya, J. L.; Iglesias, D. J.; Talón, M.; Primo-Millo, E. 2003. Histología y citología de cítricos. Valencia, Generalitat Valenciana, Conselleria D'Agricultura, Peixca I Alimentació. 99 p. (Sèrie Divulgació Tècnica no. 54)
64. Talón, M.; Zacarias, L.; Primo-Millo, E. 1990. Hormonal changes associated with fruit set and development in mandarins differing in their parthenocarpic ability. *Plant Physiology*. 79: 400-406.
65. _____.; _____.; _____. 1992. Gibberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins. *Plant Physiology*. 99: 1575-1581.
66. _____.; Tadeo, F. R.; Juan, M.; Soler, J.; Agustí, M.; Primo-Millo, E. 2001. Mejora del cuajado del fruto de los cítricos mediante

aplicaciones de ácido giberélico. Fruticultura Profesional. no. 116: 31-45.

67. UNITED STATES PATENT. 1998. Mandarin tangerine called Nadorcott. (en línea). Washington, D. C. s.p. Consultado jun. 2013. Disponible en <http://www.google.com/patents/USPP10480>
68. UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA (URUGUAY). FACULTAD DE AGRONOMÍA. 2010. Curso de botánica. Montevideo, Facultad de Agronomía. 221 p.
69. Vardi, A.; Levin, I.; Carmi, N. 2008. Induction of seedlessness in citrus; from classical techniques to emerging biotechnological approaches. Journal of the American Society of Horticultural Science. 133 (1): 117-126.
70. Williams, R. R. 1965. The effects of summer nitrogen applications on the quality of apple blossom. The Journal of Horticulture Science. 40: 31-34.